

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-121349

(P2003-121349A)

(43) 公開日 平成15年4月23日 (2003. 4. 23)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 1 N 21/27		G 0 1 N 21/27	C 2 G 0 4 3
21/05		21/05	2 G 0 5 7
21/64		21/64	G 2 G 0 5 9
27/447		30/74	Z
30/74		33/543	5 9 5
審査請求 未請求 請求項の数37 O L (全 29 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-226494 (P2002-226494)

(22) 出願日 平成14年8月2日 (2002. 8. 2)

(31) 優先権主張番号 特願2001-238884 (P2001-238884)

(32) 優先日 平成13年8月7日 (2001. 8. 7)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 宗林 孝明

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社内

(72) 発明者 高山 英士

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社内

(74) 代理人 100092978

弁理士 真田 有

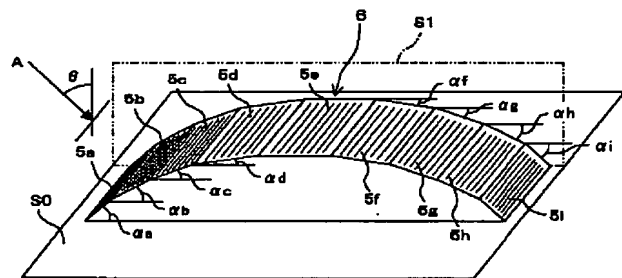
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン共鳴センサチップ、並びにそれを用いた試料の分析方法及び分析装置

(57) 【要約】

【課題】 回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップを用いた試料の分析において、簡単な光学系の構成によりリアルタイム測定と大面積の同時測定とを同時に実現可能にする。

【解決手段】 表面プラズモン共鳴センサチップ1の回折格子面5a～5iを従来のように一定の平面にするのではなく、基準面S0に対してそれぞれ異なる傾斜角度 ( $\alpha a > \alpha b > \alpha c > \alpha d > 0 > \alpha f > \alpha g > \alpha h > \alpha i$ ) に配置することによって、光の照射方向Aに対する実質的な入射角度に分布を持たせる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 光の照射により表面に表面プラズモン波を誘起する金属層と、

上記金属層の近傍に形成され、光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が一定の溝方向及び溝ピッチで形成された複数の回折格子面とを備え、

上記各回折格子面は、所定の基準平面に垂直な特定平面に対して垂直で且つ上記基準平面に対してそれぞれ所定の傾斜角度をなして配置されるとともに、それぞれ上記特定平面に垂直な溝方向で上記回折格子が形成されていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項2】 上記回折格子面が上記特定平面に平行な方向に複数配置され、各回折格子面は上記特定平面に平行な一方向から見たときの上記基準平面に対する傾斜角度が次第に小さくなるように順に配置されていることを特徴とする、請求項1記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項3】 上記回折格子面は、光が照射される側に凸の山状に連続して配置されていることを特徴とする、請求項1又は2記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項4】 上記回折格子面は一つの溝のみを有する最小幅に形成され、上記回折格子面の集合により光が照射される側に凸の弧状の曲面が構成されていることを特徴とする、請求項3記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項5】 上記各回折格子面は試料と接するセンサ面に沿って形成され、上記センサ面には試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が上記各回折格子面毎に固定化されていることを特徴とする、請求項1～4の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項6】 上記結合物質が上記回折格子面毎に複数種固定化されていることを特徴とする、請求項5記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項7】 上記回折格子面が集約して配置される回折領域が複数設けられ、各回折領域には異なる傾斜角度の回折格子面が複数配置されていることを特徴とする、請求項1～6の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項8】 上記各回折格子面は試料と接するセンサ面に沿って設けられ、上記センサ面に試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が上記各回折領域に対応して複数種固定化されていることを特徴とする、請求項7記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項9】 上記センサ面には、回折格子が形成されていない非回折面が上記各回折格子面と同一平面上に設けられていることを特徴とする、請求項5～8の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項10】 上記回折格子面毎に、上記結合物質が

固定化された反応領域と、試料中の検出種と特異的な結合をおこさない物質が固定化されるか、或いは何ら物質が固定化されていない非反応領域とが設けられていることを特徴とする、請求項5～8の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項11】 上記回折格子面が溝方向に垂直な方向に並んで配置されると共に、上記センサ面を覆う蓋を備え、上記センサ面と上記蓋との間には、上記回折格子面の配置方向に向けて複数の流路が並列して形成されていることを特徴とする、請求項5～8の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項12】 上記各回折領域に対応して、上記回折格子が形成されていない非回折面が集約した非回折領域が設けられていて、

上記非回折領域を構成する各非回折面は、対応する回折領域を構成する各回折格子面の上記基準平面に対する傾斜角度の分布と同一の、上記基準平面に対する傾斜角度の分布を有することを特徴とする、請求項7又は8に記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項13】 上記各回折領域のうちの一部に、試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された反応領域が設けられていて、

他の回折領域には、試料中の検出種と特異的な結合をおこさない物質が固定化されるか、或いは何ら物質が固定化されていない非反応領域が設けられていることを特徴とする、請求項7又は8に記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項14】 上記センサ面を覆う蓋を備えると共に、上記センサ面と上記蓋との間に複数の流路を並列して形成され、

上記各流路毎に、上記回折領域が設けられていることを特徴とする、請求項7又は8に記載の表面プラズモン共鳴センサチップ。

【請求項15】 請求項5～8の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、上記センサ面に試料を接触させて、上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップと、上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、計測された上記各回折格子面からの反射光の強度と上記各回折格子面の上記基準平面に対する傾斜角度とに基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を算出するステップと、算出された共鳴角度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴する、分析方法。

【請求項16】 請求項9又は12に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、

上記センサ面に試料を接触させて、上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップと、  
 上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、  
 上記非回折面からの反射光の強度を考慮して、上記各回折格子面からの反射光の強度を補正するステップと、  
 補正された上記各回折格子面からの反射光の強度と上記各回折格子面上の基準平面に対する傾斜角度とに基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を算出するステップと、  
 算出された共鳴角度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項17】 請求項10又は13に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いての試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、  
 上記センサ面に試料を接触させて、上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップと、  
 上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、  
 計測された上記各回折格子面からの反射光の強度と上記各回折格子面上の基準平面に対する傾斜角度とに基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を上記反応領域及び非反応領域のそれぞれについて算出するステップと、  
 算出された上記各反応領域における共鳴角度を、上記非反応領域における共鳴角度を考慮して補正した共鳴角度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項18】 請求項11又は14に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、  
 異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を流しながら上記特定平面に平行に一定の入射角度で上記センサ面に光を照射するステップと、  
 上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、  
 計測された上記各回折格子面からの反射光の強度と上記回折格子面上の基準平面に対する傾斜角度とに基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じている共鳴角度を、上記各流路を流れる試料毎に算出するステップと、  
 上記流路毎に算出された共鳴角度に基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項19】 請求項5～8の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、  
 上記センサ面に試料を接触させて、上記特定平面に平行

に一定の入射角度で光を照射するステップと、  
 上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、  
 計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップと、  
 測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、上記選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項20】 請求項9又は12に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、  
 上記センサ面に試料を接触させて、上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップと、  
 上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、  
 上記非回折面からの反射光の強度を考慮して、上記各回折格子面からの反射光の強度を補正するステップと、  
 補正された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップと、  
 測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、上記選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項21】 請求項10又は13に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、  
 上記センサ面に試料を接触させて、上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップと、  
 上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、  
 計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて測定するステップと、  
 測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて選定し、上記選定された反応領域からの反射光の強度の変化量と上記選定された非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項22】 請求項11又は14に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う方法であって、  
 異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各

流路に割り当てられた試料を流しながら上記特定平面に平行に一定の入射角度で上記センサ面に光を照射するステップと、

上記センサ面からの反射光を受光して、上記各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップと、

計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップと、

計測された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を上記流路毎に選定し、上記流路毎に選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップとを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項23】 上記表面プラズモン共鳴センサチップ上に試料を導入するに先立ち、物理的及び／又は化学的な作用によって試料を分離する試料分離ステップを備えたことを特徴とする、請求項15～22の何れかの項に記載の分析方法。

【請求項24】 試料分離ステップでは、液体クロマトグラフィー、HPLC (high performance liquid chromatography)、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ電気泳動、フローインジェクション或いはマイクロチャネルを用いた分離方法のいずれかの手法により試料を分離することを特徴とする、請求項23記載の分析方法。

【請求項25】 上記検出種は発光物質であり、上記センサ面に光を照射するに先立ち、或いは、上記センサ面に光を照射して反射光を受光した後、上記結合物質に結合した上記発光物質の発光光を検出するステップを備え、

上記分析ステップでは、上記発光光の検出結果も併せて総合的に試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うことを特徴とする、請求項15～24の何れかの項に記載の分析方法。

【請求項26】 請求項5～8の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、上記センサ面に試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度と上記各回折格子面の上記基準平面に対する傾斜角度とに基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を算出する

算出手段と、

上記算出手段により算出された共鳴角度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項27】 請求項9又は12に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記非回折面からの反射光の強度を考慮して、上記各回折格子面からの反射光の強度を補正する補正手段と、

上記補正手段により補正された上記各回折格子面からの反射光の強度と上記各回折格子面の上記基準平面に対する傾斜角度とに基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を算出する算出手段と、

上記算出手段により算出された共鳴角度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項28】 請求項10又は13に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度と上記各回折格子面の上記基準平面に対する傾斜角度とに基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を上記反応領域及び非反応領域のそれぞれについて算出する算出手段と、

上記算出手段により算出された上記各反応領域における共鳴角度を、上記非反応領域における共鳴角度を考慮して補正した共鳴角度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項29】 請求項11又は14に記載の表面プラ

ズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、  
上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を導入する試料導入手段と、

上記試料導入手段により上記各流路に試料が導入された状態において、上記センサ面に向けて上記特定平面に平行に一定の入射角度で上記センサ面に光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、  
上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度と上記各回折格子面上の基準平面に対する傾斜角度とに基づき、上記エバネッセント波と上記表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を上記流路毎について算出する算出手段と、

上記算出手段により算出された共鳴角度に基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析方法。

【請求項30】 請求項5～8の何れかの項に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、  
上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する測定手段と、

上記測定手段により測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、上記選定された回折格子面からの反射光強度の変化量に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項31】 請求項9又は12に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって上記センサ面に試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段に

より保持された状態において、上記センサ面に向けて上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、  
上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する計測手段と、

上記非回折面からの反射光の強度を考慮して、上記各回折格子面からの反射光の強度を補正する補正手段と、

上記補正手段により補正された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する測定手段と、

上記測定手段により測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、上記選定された回折格子面からの反射光強度の変化量に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項32】 請求項10又は13に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記センサ面に試料を接触させた状態で上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、上記センサ面に向けて上記特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度を計測する

計測手段と、

上記計測手段により計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて測定する測定手段と、

上記測定手段により測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、上記選定された反応領域からの反射光の強度の変化量と上記選定された非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項33】 請求項11又は14に記載の表面プラズモン共鳴センサチップを用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析装置であって、

上記表面プラズモン共鳴センサチップを保持する保持手段と、

上記表面プラズモン共鳴センサチップが上記保持手段により保持された状態において、異なる複数の試料を上記複数の流路に割り当て、上記各流路に割り当てられた試料を導入する試料導入手段と、

上記試料導入手段により上記各流路に試料が導入された

状態において、上記センサ面に向けて一定の方向から光を照射する光照射手段と、

上記センサ面からの反射光を受光する受光手段と、

上記受光手段により受光した上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する測定手段と、上記測定手段により測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を上記流路毎に選定し、上記流路毎に選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、上記各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う分析手段とを備えたことを特徴とする、分析装置。

【請求項34】 上記表面プラズモン共鳴センサチップ上に試料を導入するに先立ち、物理的及び／又は化学的な作用によって試料を分離する試料分離手段を備えたことを特徴とする、請求項26～33の何れかの項に記載の分析装置。

【請求項35】 上記試料分離手段は、液体クロマトグラフィー、HPLC (high performance liquid chromatography)、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ電気泳動、フローインジェクション或いはマイクロチャンネルを用いた分離方法の何れかの手法により試料を分離することを特徴とする、請求項34記載の分析装置。

【請求項36】 上記検出種は発光物質であり、上記受光手段は上記結合物質に結合した上記発光物質の発光光も検出可能に構成され、

上記分析手段は、上記受光手段による上記発光光の検出結果も併せて総合的に試料の定量的及び／又は定性的な分析を行なうように構成されていることを特徴とする、請求項26～35の何れかの項に記載の分析装置。

【請求項37】 光の照射により表面に表面プラズモン波を誘起しうる金属層と、

上記金属層の近傍に形成され、光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が一定の溝方向及び溝ピッチで形成された回折格子曲面とを備え、

上記回折格子曲面は光が照射される側に向けて凸の弧状の曲面形状を有し、所定の基準平面に垂直な特定平面に対し垂直に配置されるとともに、上記特定平面に垂直な溝方向で上記回折格子が形成されていることを特徴とする、表面プラズモン共鳴センサチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップの構造に関し、特に、小型臨床機器やHPLC用検出器に用いて好適のセンサチップの構造に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、生化学や医療検査等の分野においては、化学種、生化学種又は生物種等の検出種を含む試料流体の定量的及び／又は定性的な分析方法として、表

面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した分析方法が知られている。表面プラズモン共鳴は、金属層に光が入射した場合に金属表面に誘起される表面プラズモン波が入射光により生成されたエバネッセント波に共鳴して励起される現象である。表面プラズモン共鳴は入射光の波長及び角度に依存しており、表面プラズモン共鳴が励起されたときには、特定の入射角又は特定の波長を有する光成分の光エネルギーが表面プラズモン波へ移行することにより、対応する入射角又は波長を有する反射光が大きく減少するという特徴がある。

【0003】表面プラズモン共鳴を起こすためには、特定の表面プラズモン波を有する金属と、表面プラズモン波と共鳴するエバネッセント波を誘起する光学構造とが必要となる。エバネッセント波を誘起する光学構造としては現在二つの構造が知られている。一つはプリズムの全反射を利用した光学構造であり、もう一つは回折格子を利用した光学構造である。上記の金属にこれらの光学構造を組み合わせた素子は一般に表面プラズモン共鳴センサチップ (以下、センサチップ) と呼ばれている。

【0004】通常、センサチップは基体に金属層を積層した構造を有し、金属層上には、特定の検出種と相互作用して特異的に結合しうる結合物質 (リガンド、分子認識素子) が塗布されて固定化される。この結合物質が固定化された金属層の表面に試料を接触させることにより、結合物質に試料中の検出種が捕捉される。表面プラズモン共鳴は金属層の表面における媒質の屈折率にも依存しており、媒質の屈折率が変化すれば波長一定の場合には共鳴角が変化し、また、入射角度一定の場合には共鳴波長が変化する。したがって、反射光の強度に基づき共鳴角或いは共鳴波長を調べることで金属層の表面における媒質の屈折率を分析することができる。この場合、金属層の表面の媒質の屈折率の変化は、結合物質に捕捉される検出種の物質質量、すなわち試料中の検出種の濃度の変化に対応していることから、表面プラズモン共鳴が起きる共鳴角或いは共鳴波長を調べることで、試料中の検出種の濃度等を分析することができる。

【0005】このようなセンサチップのうち、プリズム型のセンサチップは、一般にセンサチップ本体 (透明基体上に金属層が積層されたもの) とプリズムとから構成されている。センサチップは基本的には使い捨てであるが、プリズムは高価であるためセンサチップ本体だけでなくプリズムまでも使い捨てにすると測定コストが非常に高くなってしまふ。このため、この型のセンサチップでは、一般にセンサチップ本体とプリズムとが別で、使用時にプリズムをセンサチップ本体に密着させてプリズムに光を入射し、反射光を検出し測定するようになっている。

【0006】一方、回折格子型のセンサチップは、表面に凹凸形状 (グレーティング) を有する透明基体上に金属層を積層された構造となっている。凹凸形状上に金属

層が積層されることで、金属層の表面にも凹凸形状が現れ、この金属層の表面の凹凸形状が回折格子として機能する。この型のセンサチップは、プリズム型のような高価なプリズムを使用しないため安価であり、使い捨てが可能である。また、プリズム型のようにプリズムとセンサチップ本体を密着させる作業が不要なため、密着度合いのばらつきといった不具合もなく測定値の再現性が良いという利点もある。

【0007】また、プリズム型のセンサチップではプリズムを入射光及び反射光の経路とするという構造上、ビームの径やビームを照射できる領域に制約があるが、回折格子型のセンサチップにはこのような制約はなく、大径のビームを使用することができ、また任意の位置にビームを照射することができる。したがって、回折格子型のセンサチップはプリズム型に比較して一度に大面積を検査することができ、また、センサチップ上の任意の位置について検査することができるという利点がある。このような利点から、今日、回折格子型のセンサチップに対する期待が高まっている。

【0008】回折格子型のセンサチップを用いた試料の分析方法としては、入射角度一定の条件で共鳴波長を検出する分析方法と、入射波長一定の条件で共鳴角度を検出する分析方法とが一般的である。このうち、前者の方法では、入射角度の設定によっては共鳴波長が測定器の測定レンジ外になってしまう場合があり、その場合には光学系を再調整する必要が生じる。これに対して後者の方法では、予め測定レンジ内に入るような入射波長を選択することができるので、前者の方法のような問題はない。

【0009】入射波長一定の条件で共鳴角度を検出する方法には、一般に次の4つの方法が知られている。第1の方法は、入射光の入射角度を変化させながら（これを角度スキャンという）、反射光を検出する検出器の検出角度も同期して変化させていき、共鳴角を検出する方法である。第2の方法は、第1の方法と同様に入射光の角度スキャンを行いながら、角度固定式の検出器（CCD等のアレー型検出器）を用いて反射光を検出し、共鳴角を検出する方法である。

【0010】第3の方法は、入射光として楔形の光を照射し、検出器の検出角度を反射光の反射角度範囲内で変化させ、共鳴角を検出する方法である。そして、第4の方法は、第3の方法と同様に入射光として楔形の光を照射し、その反射光を角度固定式の検出器を用いて検出し、共鳴角を検出する方法である。さらに、上記の方法に加え、入射角度、入射波長ともに一定の条件で行う分析方法も知られている。この方法（第5の方法）は、入射角度或いは入射波長に対する反射光の強度分布は、結合物質に捕捉された検出種の量、すなわち試料中の検出種の濃度に応じて変化することから、入射角度、入射波長一定の条件で反射光の強度を計測し、その条件におけ

る強度の変化量（試料に接していない状態からの変化量）に基づき濃度等を分析するようにしたものである。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記の各分析方法には、それぞれ次のような課題がある。まず、第1、第2の方法では、入射光の角度スキャンを行うために光源の光軸角度を変化させるための駆動機構が必要となり、コストアップを招いてしまう。また、駆動機構を必要とするために装置が大型化してしまい、ホームユースやPOC（ポイントオブケア）等の用途には適用しにくい。また、 $mdeg$ 単位での角度制御が必要となるため、十分な精度を得るのが難しいという課題もある。さらに、角度スキャンに時間がかかるため、非常に速い反応には追従することができず、リアルタイム測定には不向きである。

【0012】また、第3、第4の方法では、入射光の角度スキャンの必要はないものの、様々な角度からセンサチップ表面の測定点に光が入射するように、入射光の楔形の頂点を測定点にあてるようにする必要があるため、大面積の測定や一度に複数の測定点を同時に測定する多点同時測定には不向きである。このため、プロテインチップやDNAチップ等の集積化には対応することはできず、上述した回折格子型のセンサチップの利点を十分に生かすことができない。

【0013】さらに、第5の方法では、第3、第4の方法と同様に入射光の角度スキャンの必要はなく、駆動機構を必要としない精度の高い分析が可能であるものの、表面プラズモン波のスペクトルの形状の特性から測定レンジ（測定許容範囲）が狭く、あまり広い濃度域に対しては有効ではない。このため、測定レンジを超えてしまった場合には、再度入射角度を再調整して反射光の強度変化を計測せねばならないという課題がある。

【0014】本発明は、このような課題に鑑み創案されたもので、その第1の目的は、簡単な光学系の構成によりリアルタイム測定と大面積の同時測定とを同時に実現可能にした表面プラズモン共鳴センサチップと、それを用いた試料の分析方法及び分析装置を提供することにある。また、その第2の目的は、反射光の強度の変化量に基づき分析を行う場合において、測定レンジの拡大により広い濃度域の試料にも対応できるようにした表面プラズモン共鳴センサチップと、それを用いた試料の分析方法及び分析装置を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、発明者は、光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が形成された回折格子面と、回折格子面に沿って設けられ光の照射により表面に表面プラズモン波を誘起しうる金属層とを備えた回折格子型の表面プラズモン共鳴センサチップにおいて、その回折格子面に光の照射方向に対して角度の分布を持たせ



ることにより、上記の第1、第2の目的をともに達成できることを見出し、本発明を完成した。

【0016】まず、本発明の第1の表面プラズモン共鳴センサチップ（第1のセンサチップ）は、光の照射により表面に表面プラズモン波を誘起しうる金属層と、上記金属層の近傍に形成され、光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が一定の溝方向及び溝ピッチで形成された複数の回折格子面とを備え、上記各回折格子面は、所定の基準平面に垂直な特定平面に対して垂直で且つ上記基準平面に対してそれぞれ所定の傾斜角度をなして配置されるとともに、それぞれ上記特定平面に垂直な溝方向で回折格子が形成されていることを特徴としている。

【0017】このような構成により、上記特定平面に平行に一定の方向から光（平行光）を照射したときには、各回折格子面の基準平面に対する傾斜角度に応じて各回折格子面への照射光の入射角度に分布が生じ、各回折格子面から得られる反射光の強度にも分布が生じる。したがって、各回折格子面から得られる反射光の強度と各回折格子面への実質的な入射角度とに基づき、共鳴角度をリアルタイムで算出することが可能になる。つまり、上記のような構成のセンサチップを用いることにより、角度スキャンや楔形の光の照射によることなく、同時に複数の角度から光を照射する場合と同様の効果が得られる。

【0018】なお、回折格子面が特定平面に平行な方向に複数配置される場合には、特定平面に平行な一方向から見たときの基準平面に対する傾斜角度が次第に小さくなるように各回折格子面を順に配置するのが好ましい。これにより、各回折格子面からの反射光が交錯することがなく、各回折格子面からの反射光の強度の分析が容易になる（請求項2）。

【0019】また、上記回折格子面を、光が照射される側に凸の山状に連続して配置することが好ましい。これにより、回折格子面の各位置からの反射光が交錯することがなく、回折格子面の各位置からの反射光の強度の分析が容易になる（請求項3）。

【0020】また、上記回折格子は、一つの溝のみを有する最小幅に形成され、上記回折格子面の集合により光が照射される側に凸の弧状の曲面が構成されるようにしてもよい（請求項4）。

【0021】また、回折格子面が集約して配置される回折領域を複数設け、各回折領域には異なる傾斜角度の回折格子面を複数配置するのも好ましい（請求項7）。この場合は、特定平面に平行に一定の方向から光を照射するだけで各回折領域における共鳴角度を同時に検出することができるので、各回折領域に対応して結合物質を固定化することによって多点同時測定を容易に行うことができる。

【0022】上記の第1のセンサチップにおいて、各回

折格子面は試料と接するセンサ面に沿って設けられている。そして、第1のセンサチップを試料の定量的及び／又は定性的な分析に用いる場合には、センサ面に試料中の検出種（化学種、生化学種又は生物種等）と特異的に結合する結合物質（抗原抗体反応、相補的DNA結合、リセプター／リガンド相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって検出種を捕捉できる物質）を固定化したものを用いる（請求項5）。特に、多点同時測定用のセンサチップの場合には、各回折領域に対応して結合物質を複数種固定化したものを用いることによって、同時に複数種の検出種について分析が可能になる（請求項8）。

【0023】また、上記結合物質を上記回折格子面毎に複数種固定化しても良い（請求項6）。

【0024】また、上記センサ面に、回折格子が形成されていない非回折面を上記各回折格子面と同一平面状に設けてもよい（請求項9）。また、上記各回折領域に対応して、上記回折格子が形成されていない非回折面が集約した非回折領域を設け、上記非回折領域を構成する各非回折面を、対応する回折領域を構成する各回折格子面の上記基準平面に対する傾斜角度の分布と同一の、上記基準平面に対する傾斜角度の分布を有するよう形成してもよい（請求項12）。

【0025】また、上記回折面毎に、上記結合物質が固定化された反応領域と、試料中の検出種と特異的な結合を起こさない物質とを固定化するか、或いは何ら物質が固定化されていない非反応領域とを設けてもよい（請求項10）。また、上記各回折領域のうちの一部に、試料中の検出種と特異的に結合する結合物質が固定化された反応領域を設け、他の回折領域には、試料中の検出種と特異的な結合をおこさない物質が固定化されるか、或いは何ら物質が固定化されていない非反応領域を設けてもよい（請求項13）。

【0026】また、上記回折格子面を溝方向に垂直な方向に並んで配置するとともに、上記センサ面を覆う蓋を設け、上記センサ面と上記蓋との間に、上記回折格子面の配置方向に向けて複数の流路を並べて形成してもよい（請求項11）。また、上記センサ面を覆う蓋を備えると共に、上記センサ面と上記蓋との間に複数の流路を並列して形成し、上記各流路毎に、上記回折領域を設けてもよい（請求項14）。

【0027】第1のセンサチップを用いて行う試料の分析方法には、次の8つの方法がある。第1の分析方法は共鳴角度を算出して共鳴角度に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、センサ面に試料を接触させて特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップ、各回折格子面からの反射光を受光し、受光した各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された反射光の強度と各回折格子面の基準平面に対する傾斜角度とに基づき共鳴角度を算出するステ



ップ、算出された共鳴角度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項15）。

【0028】この場合、角度スキャンによることなく瞬時に共鳴角度を算出することができるので、リアルタイム測定が可能になるとともに、楔形の光の照射によることなく共鳴角度を算出することができるので、一度に大面積を測定することも可能になる。したがって、回折格子面が集約配置された回折領域が複数設けられた多点同時測定用のセンサチップを用いた場合には、多点同時測定をリアルタイムに行うこともできる。また、光源の光軸は一定でよく且つ平行光でよいので光学系も簡単にすることができる。なお、これらの各ステップは記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。特に、各ステップを同時に実行する場合には、試料中の検出種が結合物質に結合していく様子をリアルタイムでモニタすることができる。

【0029】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて特定平面に平行に一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、算出手段と分析手段とを備えている。算出手段は、計測手段により計測された各回折格子面からの反射光の強度と各回折格子面の基準平面に対する傾斜角度とに基づき共鳴角度を算出する手段であり、分析手段は、算出手段により算出された共鳴角度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項26）。

【0030】第2の分析方法は、共鳴角度を算出して共鳴角度に基づき試料の分析を行う分析方法であり、センサ面に試料を接触させて、特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップ、センサ面からの反射光を受光して、各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、非回折面からの反射光の強度を考慮して、各回折格子面からの反射光の強度を補正するステップ、計測された各回折格子面からの反射光の強度と各回折格子面の基準平面に対する傾斜角度とに基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を算出するステップ、算出された共鳴角度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項16）。

【0031】ここで、補正の際に考慮すべき反射光を反射している非回折面は、補正しようとする反射光が反射している回折格子面と同じ、上記基準平面に対する傾斜

角度を有していなくてはならない。したがって、同一平面状に回折格子面と非回折面とが存在していない場合には、各回折格子面に対応する非回折面を特定し、その非回折面からの反射光を考慮して補正を行う必要がある。

【0032】この場合、第1の分析方法と同様の利点の他、非回折面からの反射光の強度を考慮して各回折格子面からの反射光の強度を補正するため、各回折格子面の表面特性の差による反射光の強度の誤差を補正することができる。

【0033】なお、表面特性とは、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象以外のセンサチップ表面にかかる要素のうち、センサチップからの反射光強度を弱めるものをいう。例えば、入射光を散乱させる試料溶液の濁りや、試料溶液中に含まれる入射光の吸収物質などの、センサチップからの反射光を弱める要素や、ゆがみ、たわみ、膨潤、収縮など微量な理想平面からの変位のことをいう。また他にも、試料中の成分がセンサチップ表面に非特異的に吸着する場合には、この非特異的に吸着した物質によって入射光は散乱されたり吸収されたりして、センサチップからの反射光の強度は減少する。

【0034】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて特定平面に平行に一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、補正手段と算出手段と分析手段とを備えている。補正手段は、非回折面からの反射光の強度を考慮して、各回折格子面からの反射光の強度を補正する手段であり、算出手段は、補正手段により補正された各回折格子面からの反射光の強度と各回折格子面の基準平面に対する傾斜角度とに基づき共鳴角度を算出する手段であり、分析手段は、算出手段により算出された共鳴角度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項27）。

【0035】第3の分析方法は、共鳴角度を算出して共鳴角度に基づき試料の分析を行う分析方法であり、センサ面に試料を接触させて、特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップ、センサ面からの反射光を受光して、各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された各回折格子面からの反射光の強度と各回折格子面の基準平面に対する傾斜角度とに基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて算出するステップ、算出された反応領域におけ

る共鳴角度を非反応領域における共鳴角度を考慮して補正した共鳴角度に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項17）。

【0036】この場合、第1の分析方法と同様の利点の他、反応領域における共鳴角度を非反応領域における共鳴角度で補正するため、反応によって生じる検出種の変化をより正確に分析することができる。

【0037】なお、この方法における補正は、単なる反射光の強度の補正ではなく、検出しようとする特異的反應ではない要素による共鳴角度のシフトを用いて行う反応量の補正であるため、共鳴角度が求められるならば必ずしも反応領域と非反応領域とが上記基準平面に対して同じ傾斜角度を有していなくてもよい。

【0038】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて特定平面に平行に一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、算出手段と分析手段とを備えている。算出手段は、計測手段により計測された各回折格子面からの反射光の強度と各回折格子面の基準平面に対する傾斜角度とに基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を反応領域及び非反応領域それぞれについて算出する手段であり、分析手段は、算出手段により算出された反応領域における共鳴角度を非反応領域における共鳴角度を考慮補正した共鳴角度に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項28）。

【0039】第4の方法は、共鳴角度を算出して共鳴角度に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、異なる複数の試料を複数の流路に割り当て、各流路に割り当てられた試料を流しながら特定平面に平行に一定の入射角度でセンサ面に光を照射するステップ、センサ面からの反射光を受光して、各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された各回折格子面からの反射光の強度と回折格子面の基準平面に対する傾斜角度とに基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じている共鳴角度を、各流路を流れる試料毎に算出するステップ、流路毎に算出された共鳴角度に基づき、各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項18）。

【0040】この場合、第1の分析方法と同様の利点の他、複数の試料を同時に分析することができるため作業

が効率的に行える。また、複数の試料を同じ条件下で分析できるため、試料の違いを明確に分析することができる。

【0041】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップを保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップに、試料導入手段により異なる複数の試料をセンサチップ上の複数の流路に割り当てて導入し、試料導入手段により各流路に試料が導入された状態のセンサチップのセンサ面に向けて特定平面に平行に一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、算出手段と分析手段とを備えている。算出手段は、計測手段により計測された各回折格子面からの反射光の強度と各回折格子面の基準平面に対する傾斜角度とに基づき、エバネッセント波と表面プラズモン波との共鳴現象が生じる共鳴角度を各流路毎について算出する手段であり、分析手段は、算出手段により算出された各流路における共鳴角度に基づき、各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項29）。

【0042】第5の分析方法は、反射光の強度の変化量を測定して強度変化量に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、センサ面に試料を接触させて特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップ、各回折格子面からの反射光を受光し、受光した各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された上記各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップ、測定した変化量が所定の測定許容範囲（測定レンジ）内にある回折格子面を選定し、選定した回折格子面からの反射光強度の変化量に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項19）。

【0043】これにより、試料の濃度域が広い場合でも測定値が測定レンジ内に入るように光学系を再調整する必要がなく、実質的に測定レンジを拡大することが可能になる。なお、この場合も各ステップは記載順に実行してもよく、同時に実行してもよい。

【0044】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて特定平面に平行に一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射

光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、測定手段と分析手段とを備えている。測定手段は、測定手段は、計測装置により計測された各回折格子面からの反射光の強度の、センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する手段であり、分析手段は、測定した反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、選定した回折格子面からの反射光強度の変化量に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項30）。

【0045】第6の分析方法は、反射光の強度の変化量を測定して強度変化量に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、センサ面に試料を接触させて特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップ、各回折格子面からの反射光を受光し、受光した各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された上記各非回折格子面からの反射光の強度を考慮して、上記各回折格子面からの反射光の強度を補正するステップ、補正された各回折格子面からの反射光の強度の、上記センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップ、測定した変化量が所定の測定許容範囲（測定レンジ）内にある回折格子面を選定し、選定した回折格子面からの反射光強度の変化量に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項20）。

【0046】なお、第2の分析方法と同様に、補正の際に考慮すべき反射光を反射している非回折面は、補正しようとする反射光が反射している回折格子面と同じ、上記基準平面に対する傾斜角度を有していなくてはならない。したがって、同一平面状に回折格子面と非回折面とが存在していない場合には、各回折格子面に対応する非回折面を特定し、その非回折面からの反射光を考慮して補正を行う必要がある。

【0047】この場合、第5の分析方法と同様の利点の他、非回折面からの反射光の強度を考慮して各回折格子面からの反射光の強度を補正するため、各回折格子面の表面特性の差による反射光の強度の誤差を補正することができる。

【0048】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて特定平面に平行に一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光し

た反射光から試料を分析するための手段として、補正手段と測定手段と分析手段とを備えている。補正手段は、非回折面からの反射光の強度を考慮して、各回折格子面からの反射光の強度を補正する手段であり、測定手段は、補正手段により補正された各回折格子面からの反射光の強度の、センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する手段であり、分析手段は、測定した反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を選定し、選定した回折格子面からの反射光強度の変化量に基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項31）。

【0049】第7の分析方法は、反射光の強度の変化量を測定して強度変化量に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、センサ面に試料を接触させて特定平面に平行に一定の入射角度で光を照射するステップ、各回折格子面からの反射光を受光し、受光した各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された各回折格子面からの反射光の強度の、センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて測定するステップ、測定された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて選定し、選定された反応領域からの反射光の強度の変化量と選定された非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項21）。

【0050】なお、第3の方法と同様に、この方法における補正は、単なる反射光の強度の補正ではなく、検出しようとする特異的反応ではない要素による共鳴角度のシフトを用いて行う反応量の補正であるため、共鳴角度が求められるならば必ずしも反応領域と非反応領域とが上記基準平面に対して同じ傾斜角度を有していなくてもよい。

【0051】この場合、第5の分析方法と同様の利点の他、反応領域における共鳴角度を非反応領域における共鳴角度で補正するため、反応によって生じる検出種の変化をより正確に分析することができる。

【0052】この分析装置は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップをそのセンサ面に試料を接触させた状態で保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップのセンサ面に向けて特定平面に平行に一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、測定手段と分析手段とを備えている。測定手段は、計測装置に

より計測された各回折格子面からの反射光の強度の、センサ面に試料が接触していない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する手段であり、分析手段は、測定した反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を反応領域及び非反応領域のそれぞれについて選定し、選定した回折格子面からの反射光強度の変化量と選定された非反応領域からの反射光の強度の変化量とに基づき試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項32）。

【0053】第8の分析方法は、反射光の強度の変化量を測定して強度変化量に基づき試料の分析を行う分析方法であり、この分析方法では、異なる複数の試料を複数の流路に割り当て、各流路に割り当てられた試料を流しながら特定平面に平行に一定の入射角度でセンサ面に光を照射するステップ、センサ面からの反射光を受光して、各回折格子面からの反射光の強度を計測するステップ、計測された各回折格子面からの反射光の強度の、各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を測定するステップ、計測された反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を流路毎に選定し、流路毎に選定された回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、各流路を流れる試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うステップを実行する（請求項22）。

【0054】この場合、第5の分析方法と同様の利点の他、複数の試料を同時に分析することができるため作業が効率的に行える。また、複数の試料を同じ条件下で分析できるため、試料の違いを明確に分析することができる。

【0055】この分析方法は、次のような構成を有する分析装置を用いることにより実施することができる。すなわち、この分析装置は、上記の第1のセンサチップを保持手段により保持し、保持手段により保持された状態のセンサチップに、試料導入手段により異なる複数の試料をセンサチップ上の複数の流路に割り当てて導入し、試料導入手段により各流路に試料が導入された状態のセンサチップのセンサ面に向けて特定平面に平行に一定の入射角度で光照射手段により光を照射し、各回折格子面からの反射光を受光手段により受光し、受光した反射光の強度を計測手段によって計測するような装置構成を有している。そして、さらにこの分析装置は、受光手段により受光した反射光から試料を分析するための手段として、測定手段と分析手段とを備えている。測定手段は、計測装置により計測された各回折格子面からの反射光の強度の、上記各流路に試料が流れていない状態での反射光の強度に対する変化量を測定する手段であり、分析手段は、測定した反射光強度の変化量が所定の測定許容範囲内にある回折格子面を流路毎に選定し、選定した回折格子面からの反射光の強度の変化量に基づき、試料の定量的及び／又は定性的な分析を行う手段である（請求項

33）。

【0056】さらに、上述の各分析方法において、表面プラズモン共鳴センサチップ上に試料を導入するに先立ち、物理的及び／又は化学的な作用によって試料を分離する試料分離ステップを行ってもよい（請求項23）。

【0057】これにより、試料中に検出種以外の不純物が混入していたとしても、分析前に適正に除去することができ、純粋な検出種のみを分析することができる。したがって、正確な分析を行うことが可能となる。

【0058】また、これらの分析手段で通常用いられている検出方法（吸光度検出、蛍光検出、化学発光検出、示差屈折計検出、電気化学検出など）と組み合わせることにより、各種の存在物質の存在量と、その中での検出対象種の特異的反応計測による測定とを同時に行うことができる。

【0059】この分析方法は、上述の分析装置の構成に加え、表面プラズモン共鳴センサチップ上に試料を導入するに先立ち、物理的及び／又は化学的な作用によって試料を分離する試料分離手段を有するように構成した分析装置を用いることで実施できる（請求項34）。

【0060】試料分離手段としては、液体クロマトグラフィー、HPLC、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ電気泳動、フローインジェクション或いはマイクロチャンネルを用いた分離方法の何れかの手法により試料を分離することが望ましい（請求項24、請求項35）。

【0061】また、上述の各分析方法において、検出種が発光物質である場合に、センサ面に光を照射するに先立ち、或いは、センサ面に光を照射して反射光を受光した後、結合物質に結合した発光物質の発光光を検出するステップを備え、分析ステップでは、発光光の検出結果も併せて総合的に試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うようにしてもよい（請求項25）。

【0062】これにより、表面プラズモン共鳴のみでなく、発光現象を利用した分析を行えるようになる。蛍光や燐光等の発光現象は非常に高感度であるため、より微妙な反応も検出することが可能となる。

【0063】この分析手段は、上述の分析装置の構成に加えて、検出種が発光物質である場合に、受光手段が結合物質に結合した発光物質の発光光も検出可能に構成され、分析手段が、受光手段による発光光の検出結果も併せて総合的に試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うように構成した分析装置を用いることで実施できる（請求項36）。

【0064】また、本発明の第2の表面プラズモン共鳴センサチップ（第2のセンサチップ）は、光の照射により表面に表面プラズモン波を誘起しうる金属層と、金属層の近傍に形成され、光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が一定の溝方向及び溝ピッチで形成された回折格子曲面とを備え、回折格子曲面は光が照射される側に向けて凸の湖上の曲面形状を有し、所定の

基準平面に垂直な特定平面に対し垂直に配置されるとともに、特定平面に垂直な溝方向で回折格子が形成されていることを特徴としている（請求項37）。

【0065】このような構成により、上記特定平面に平行に一定の方向から光（平行光）を照射したときには、照射光の照射位置における接平面の基準平面に対する傾斜角度に応じて、回折格子面への照射光の入射角度に分布が生じ、回折格子面の各位置から得られる反射光の強度にも分布が生じる。したがって、回折格子面の各位置から得られる反射光の強度とその位置における実質的な入射角度とに基づき、共鳴角度をリアルタイムで算出することが可能になる。つまり、上記のような構成のセンサチップを用いることにより、角度スキャンや楔形の光の照射によることなく、所定の広がり角（或いは狭まり角）を有する光を照射する場合と同様の効果が得られる。

【0066】好ましくは、回折格子面の形状は、光が照射される側に向けて凸の曲面形状とする。これにより、回折格子面の各位置からの反射光が交錯することがなく、回折格子面の各位置からの反射光の強度の分析が容易になる。また、上記の回折格子面を複数設けるのも好ましい。この場合は、特定平面に平行に一定の方向から光を照射するだけで複数の回折格子面における共鳴角度を同時に検出することができるので、各回折格子面に対応して結合物質を固定化することによって多点同時測定を容易に行うことができる。

【0067】上記の第2のセンサチップにおいて、回折格子面は試料と接するセンサ面に沿って設けられている。そして、第2のセンサチップを試料の定量的及び／又は定性的な分析に用いる場合には、センサ面に試料中の検出種と特異的に結合する結合物質を固定化したものを用いる。特に、多点同時測定用のセンサチップの場合には、各回折格子面に対応して結合物質を複数種固定化したものを用いることによって、同時に複数種の検出種について分析が可能になる。

【0068】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

（A）第1実施形態

まず、図1～図5を用いて本発明の第1実施形態について説明する。図1に示すように本実施形態にかかるセンサチップ（表面プラズモン共鳴センサチップ）1は、その表面（センサ面）1aを金属層3により被覆され、金属層3上の複数箇所に回折格子が形成された回折領域6が部分的に設けられている。本実施形態では、回折格子が形成されている各回折領域6が多点同時測定による分析時の測定スポットとなる。

【0069】図2は測定スポット6を拡大して示した斜視図である。図2に示すように測定スポット6は、回折格子が形成された複数の平面（以下、回折格子面）5a

～5iが集約して配置されたものである。各回折格子面5a～5iは、金属層3上の測定スポット6外の表面を基準平面S0としたとき、この基準平面S0に垂直な特定平面S1に対して垂直で、且つ基準平面S0に対してそれぞれ所定の傾斜角度 $\alpha a \sim \alpha i$ をなして配置されている。また、各回折格子面5a～5iには、同一形状（同一溝深さ、溝ピッチ）の回折格子が特定平面S1に垂直な溝方向に形成されている。

【0070】ここでは、中央の回折格子面5eは基準平面S0に平行に配置されており、残りの回折格子面5a～5d、5f～5iは、中央から遠ざかるほど基準平面S0に対する傾斜角度が次第に大きくなるように、言い換えれば、特定平面に平行な一方方向Aから見たときの基準平面S0に対する傾斜角度が次第に小さくなるように配置されている（すなわち、 $\alpha a > \alpha b > \alpha c > \alpha d > \alpha e (\alpha e = 0) > \alpha f > \alpha g > \alpha h > \alpha i$ ）。また、各回折格子面5a～5iは、隣り合う回折格子面同士が連続するように配置されている。

【0071】この構造によれば、光がセンサチップ1のセンサ面1aに照射されると、照射光はセンサ面1a上の各測定スポット6において回折し、この回折現象によりエバネッセント波が生じる。このとき、測定スポット6への実質的な入射角度は回折格子面5a～5i毎に異なり、図2において基準平面S0に対する照射光の入射角度を $\theta$ としたとき、各回折格子面5a～5iへの実際の入射角度は、照射方向側の端部にある回折格子面5aから順に、 $\theta - \alpha a$ 、 $\theta - \alpha b$ 、 $\theta - \alpha c$ 、 $\dots$ 、 $\theta - \alpha i$ となる。このように照射光の入射角度が回折格子面5a～5i毎に異なることにより、回折現象により生じるエバネッセント波の波数も回折格子面5a～5i毎に異なったものになり、照射光が金属層3に作用することにより金属層3の表面に発生する表面プラズモン波との共鳴（SPR）の度合いも回折格子面5a～5i毎に異なったものになる。

【0072】このセンサチップ1は、図4（a）に示す基体2の表面に、まず、図4（b）に示すようにレーザ加工等により凹凸形状が形成された凹凸面4を複数箇所に部分的に形成し、次いで、図4（c）に示すように基体2の表面全面にスパッタリングや蒸着により金属層3を積層することで製造することができる。凹凸面4上に金属層3が積層されることで金属層3の表面にも凹凸面が現れ、この金属層3の表面に現れた凹凸面が回折格子面として機能し、凹凸面4が形成された各回折領域が測定スポット6となる。

【0073】基体2の材質は、表面に凹凸面4を形成することができ、金属層3を保持できる機械的強度が十分であるならばその材質に限定はない。凹凸面4の形成しやすさからは樹脂が好ましく、アクリル樹脂（ポリメタクリル酸メチルなど）、ポリエステル樹脂（ポリカーボネートなど）、ポリオレフィンなどが好適な材質として挙

げられる。金属層3は、表面プラズモン波を誘起しうるものであればその材質に限定はない。例えば、金、銀、銅、アルミニウムやこれらを含む合金等、或いは銀、銅、アルミニウムの酸化物等を用いることができる。感度や安価な点では銀が好ましいが、安定性の面では金が好ましい。金属層3の厚みは、好ましくは20～300 nmとし、より好ましくは30～160 nmとする。なお、金属層3の厚みが小さい場合には、照射光が金属層3を透過して基体2の表面に達し、照射光が基体2表面の凹凸面4において回折する場合もある。この場合は凹凸面4の凹凸形状も回折格子として機能することになる。

【0074】基体2に形成する凹凸面4は、上述のレーザ加工の他、所定の凹凸形状を備えた金型をイオンビームを用いて形成し、この金型への射出成型によって基体2とともに成型することも可能である。また、凹凸形状を持たない傾斜角のある平面だけを先に基体2の表面に形成し、その後、その上から透過型凹凸フィルムを貼り付けることでも所望の凹凸面4を形成できる。その他、微細切削技術を用いて凹凸形状を加工したり、平面に対してPDMS（ポリジメチルシロキサン）をマイクロコンタクトプリンティングすることにより凹凸形状を形成したりすることでも所望の凹凸面4を形成することができる。

【0075】凹凸面4の凹凸形状は、金属層3を積層したときにその表面に所望の回折格子が得られるように金属層3の厚み等を考慮して形成する。凹凸形状としては、矩形波形状、正弦波形状、鋸歯状形状などがあり得るが、好ましくは回折格子の溝深さ（頂から谷底まで）が10～200 nm（より好ましくは30～120 nm）、ピッチ（周期：凹凸の凸から隣接する凸までの距離）が400～1200 nm（照射光の波長と関係する）となるような周期的な凹凸形状とする。

【0076】一つの測定スポット6に形成する回折格子面の数は、2～100の範囲、より好ましくは5～50の範囲とする。回折格子面の基準平面に対する傾斜角度は、-10度～10度の範囲、好ましくは-5度～5度の範囲、より好ましくは-3度～3度の範囲とする。また、隣接する回折格子面間における傾斜角度の変化量は0.001～1度の範囲、好ましくは0.01～0.5度の範囲とする。

【0077】また、回折格子面の大きさは、測定スポット6の数にもよるが、形状が矩形の場合には短辺が5  $\mu$ m～20 mmの範囲、好ましくは20  $\mu$ m～5 mmの範囲とし、形状が円形の場合には直径が5  $\mu$ m～20 mmの範囲、好ましくは20  $\mu$ m～5 mmの範囲とする。そして、測定スポット6の形成密度としては、0.1～1,000,000個/ $\text{cm}^2$ が好ましく、1～100,000個/ $\text{cm}^2$ がより好ましい。これにより、1チップあたり、1～10,000,000個の測定スポット6

において多点同時測定が可能になる。

【0078】次に、本実施形態にかかるセンサチップ1の使用方法について説明する。センサチップ1を試料の分析に用いる際には、まず、図3に示すように各測定スポット6上に結合物質7を固定化する。この結合物質7は、抗原抗体反応、相補的DNA結合、リセプター／リガンド相互作用、酵素／基質相互作用等の相互作用によって特定の物質と特異的に結合しうる性質を備えた結合物質であり、検出すべき検出種（化学種、生化学種又は生物種等）に応じた結合物質7が選択される。試料中に複数の検出種が含まれる場合には、各検出種に応じた結合物質7がそれぞれ選択されて、それぞれ別々の測定スポット6に固定化される。

【0079】そして、このように結合物質7が固定化されたセンサチップ1を図5に示す構成の分析装置10にセットして分析を行う。この分析装置10はセンサチップ1を固定するためのホルダ11、光源12、光検出器13及び分析部14から主に構成されている。ホルダ11には検出種を含む試料流体が通過する流路11aが形成されている。センサチップ1はそのセンサ面1aが流路11aを流れる試料に接するように配置されて固定される。

【0080】光源12はセンサチップ1のセンサ面1aに向けて光を照射するようにセンサチップ1に対して流路11aを挟んで配置されている。光源12の照射方向は、特定平面S1に平行で、且つ、基準平面S0に対して所定の入射角度 $\theta$ をなすように設定されている。なお、この入射角度 $\theta$ は、各回折格子面5a～5iからの反射光の強度のうち、最小入射角の回折格子面6aからの反射光の強度が最小となるように調整しておくのが好ましい。光源12としては単色光を発するレーザ光源、特に価格、大きさの点で半導体レーザが好ましく、波長は350～1300 nm程度とするのが好ましい。また、ハロゲン・タングステンランプなどの白色光を干渉フィルターや分光器等で分光して得た単色光を光源として用いることも可能である。

【0081】光検出器13はセンサチップ1からの反射光を検出する検出器であり、光源12と同様にセンサチップ1に対して流路11aを挟んで配置されている。光検出器13としては、例えばCCD素子を集積したもの、シリコンフォトダイオードアレイ等が好ましい。なお、図中では省略しているが、P偏光のみが表面プラズモン波を共鳴させることができるため、光源12とセンサチップ1との間、またはセンサチップ1と光検出器13との間には、光源12からの照射光、或いはセンサチップ1からの反射光を偏光するための偏光子が設置されている。

【0082】分析部14は光検出器13からの検出情報に基づき分析処理を行う装置である。分析部14は、本発明にかかる算出手段或いは測定手段、及び分析手段と



して機能する。以下、分析部14の各機能とあわせて、本実施形態にかかるセンサチップ1を用いた試料の分析手順について、共鳴角度を算出して共鳴角度に基づき試料の分析を行う場合と、反射光の強度の変化量を測定して反射光強度の変化量に基づき試料の分析を行う場合とに分けて具体的に説明する。

【0083】共鳴角度に基づき試料の分析を行う場合、まず、センサチップ1をホルダ11にセットしてセンサチップ1のセンサ面1aを試料に接触させる(ステップA1)。これによりセンサ面1aの各測定スポット6に固定された結合物質7に試料流体中の検出種が特異的に結合する。そして、結合物質7に結合した検出種の物質に応じた各測定スポット6の金属層3表面近傍の媒質の屈折率が変化し、各測定スポット6における表面プラズモン波の共鳴条件が変化する。

【0084】次に、光源12からセンサ面1aに向けて照射光を照射する(ステップA2)。このとき、照射光が全ての測定スポット6を照らすように照射光の太さを調整する。センサ面1aに照射された照射光は各測定スポット6に配置された各回折格子面5a~5iにおいて回折光を生じさせる。このうち0次の回折光(反射光)を光検出器13によって検出し、検出した反射光の強度を計測する(ステップA3)。したがって、光検出器は受光手段としての役割と計測手段としての役割を果たす。

【0085】光検出器13により検出された反射光の情報は分析部14に送られる。分析部14は、光検出器13からの反射光の情報から結合物質7が固定された各測定スポット6からの反射光の強度の情報を抽出して、各測定スポット6の回折格子面5a~5i毎に反射光の強度を検出する。そして、各回折格子面5a~5iからの反射光の強度に基づき、測定スポット6毎に共鳴角度を算出する。具体的には、測定スポット6毎に反射光の強度が最小となる回折格子面を検出し、その回折格子面への実際の入射角度(基準平面S0への入射角度から傾斜角度を差し引いた角度)を共鳴角度と見なすか、或いは、反射光強度が最小の回折格子面の近傍にある複数の回折格子面の実際の入射角度と、これら回折格子面で得られる反射光強度とに基づき、反射光強度が極小となる共鳴角度を補間計算する。この場合、補間計算の方がより正確に共鳴角度を算出することができる(ステップA4-1)。

【0086】そして、分析部14は、照射した光の波長と算出した共鳴角度とを検量線(或いは理論的な濃度換算式)に照合して、各測定スポット6に対応する検出種の濃度を分析する。検量線は、濃度既知の試料を用いた試験により各検出種の濃度と共鳴波長及び共鳴角度との関係を予め求めたものであり、算出した各測定スポット6における共鳴角度をこの検量線に照合することで試料流体中の各検出種の濃度を測定できる(ステップA5-

1)。

【0087】このような手法により分析を行うことで、各測定スポット6における共鳴角度を同時に且つリアルタイムで算出することができ、多種の検出種についてのリアルタイム分析が可能になる。なお、媒質の屈折率変化が非常に大きく(例えば酵素反応により生じるものが表面に沈着する性質を持つ色素のような場合や、結合反応の増感法として金コロイドなどの微粒子を使用する場合など)、回折格子面5a~5iの角度だけでは共鳴角度のシフトに対応できないときは、入射光の角度を変更することによって対応することができる。

【0088】一方、反射光強度の変化量に基づき試料の分析を行う場合は、上述のステップA1からステップA3までの処理によりセンサ面1aからの反射光を検出すると、分析部14は、得られた反射光の情報から各測定スポット6からの反射光の情報を抽出して、各測定スポット6の回折格子面5a~5i毎に反射光の強度を検出する。そして、センサ面1aに試料が接触していない状態に対する反射光強度の変化量を回折格子面5a~5i毎に測定する(ステップA4-2)。

【0089】次に、分析部14は、反射光強度の変化量が所定の測定レンジ(測定許容範囲)内にある、すなわちレンジオーバーしていない回折格子面を測定スポット6毎に選定する。そして、選定したレンジオーバーしていない回折格子面からの反射光強度の変化量とその回折格子面の傾斜角度とを検量線(濃度既知の試料を用いた試験により回折格子面への入射角度と反射光強度の変化量との関係を予め求めたもの)に照合して、各スポット6に対応する検出種の濃度を分析する(ステップA5-2)。

【0090】エバネッセント波の波数は回折格子面への照射光の入射角度に変化することから、反射光強度の変化量も入射角度により変化し、入射角度如何によっては変化量が大きくなりすぎて分析部14に含まれる測定器の測定レンジを越えてしまう場合がある。この場合、従来は、光学系の再調整により入射角度を変更する必要があった。特に多項目測定を行う場合において、検出種間の濃度差が大きい場合には、測定しようとする検出種毎に入射角度を変更しなければならなかった。しかしながら、本実施形態のセンサチップ1には、傾斜角度が異なる複数の回折格子面5a~5iが設けられているので、照射光の入射角度を変更せずとも別の回折格子面を選定することで実質的に入射角を変更したことになる。つまり、実質的に計測レンジを拡大したことに相当する。その結果、広い計測レンジが必要となる濃度域の広い試料についても対応することが可能となる。

【0091】以上のように、本実施形態のセンサチップ1を用いて試料の分析を行うことにより、多種の検出種についてのリアルタイム分析が可能になるとともに、濃度域の広い試料についても対応することができるという



利点がある。また、このセンサチップ1を用いた分析装置10には、角度スキャンのための駆動機構を必要とせず、光源(偏光子を含む)12とセンサチップ1と光検出器13だけで光学系が構成できるので、装置の簡素化、小型化及び低コスト化が可能になるという利点もある。

【0092】近年、特に臨床検査の分野では治療の現場での検査を可能にする小型・簡便操作を特徴とするPOCが重視されており、表面プラズモン共鳴センサチップも免疫検査などに適用が考えられていたが、サイズとコストの点において従来はPOCへの展開は困難であった。しかしながら、この分析装置10によれば、サイズもコストも抑えることができるのでPOCに適用可能だけでなく、在宅検査などの領域にも適用することができる。さらには、この分析装置10は、HPLCにも好適であり、血液や尿の分析や食品中の栄養分の分析、或いは排水中の化学物質の分析等にも応用することができる。

#### 【0093】(B)第2実施形態

次に、図6を用いて本発明の第2実施形態について説明する。本実施形態にかかるセンサチップ21は、その基本構成は第1実施形態と共通しており、表面を金属層23により被覆され、金属層23上の複数箇所に回折格子が形成された回折領域(測定スポット)26が部分的に設けられている。

【0094】ここでは、測定スポット26は、回折格子が形成された曲面(以下、回折格子面)25からなり、この回折格子面25は、金属層3上の測定スポット26外の表面を基準平面S0としたとき、この基準平面S0に垂直な特定平面S1に対して垂直に配置されている。また、回折格子面25は、センサ面21a側に凸の弧状に形成されており、特定平面S1に垂直な溝方向に回折格子が形成されている。

【0095】この構造によれば、測定スポット26への実質的な入射角度は回折格子面25上の位置により異なり、図6において基準平面S0に対する照射光の入射角度を $\theta$ としたとき、回折格子面25上の各位置への実際の入射角度は、その位置における接平面の基準平面S0に対する傾斜角度を $\beta$ とすると、 $\theta - \beta$ となる。回折格子面25に接する接平面の傾斜角度は、図6に示すように $\beta 1$  ( $\beta 1 > 0$ ) から $\beta 2$  ( $\beta 2 < 0$ ) まで連続的に変化することから、回折格子面25への照射光の実質的な入射角度には $\theta - \beta 1$  から $\theta - \beta 2$  までの連続的な分布が生じることになり、その結果、回折格子面25の各位置から得られる反射光の強度にも連続的な分布が生じることになる。

【0096】このような特性により、本実施形態のセンサチップ21を用いて試料の分析を行う場合には、第1実施形態と同様の利点が得られるだけでなく、回折格子面25への照射光の実質的な入射角度が連続的に分布す

ることから、近似や補間計算によることなく共鳴角度を直接検出することができ、より正確な分析が可能になるという利点もある。

#### 【0097】(C)第3実施形態

次に、図7を用いて本発明の第3実施形態を説明する。本実施形態に係るセンサチップ31は、その基本構成は第1実施形態と共通しており、表面を金属層33により被膜され、金属層33上の複数箇所に回折格子が形成された回折領域(測定スポット)36が部分的に設けられている。

【0098】ここでは、測定スポット36は一部に回折格子を形成された回折格子面35a~35iからなり、この回折格子面35a~35iの一部には回折格子が形成されていない領域(以下、非回折面という)37a~37iが形成されている。その他の構成は、第1実施形態と同一である。

【0099】この構造によれば、測定スポット36の反射光は、回折格子面35a~35iで反射して表面プラズモン共鳴により強度を弱められた反射光(以下、共鳴反射光という)と、非回折面37a~37iで反射し、表面プラズモン共鳴の影響を受けていない反射光(以下、基準反射光という)とに別けられる。

【0100】このような特性により、本実施形態のセンサチップ31を用いて試料の分析を行う場合には、第1実施形態と同様の手法に加え、計測される共鳴反射光の強度を、共鳴反射光が反射した回折格子面と同じ回折格子面にある非回折面で反射した基準反射光の強度で補正するステップを備えることができる。これにより、第1実施形態と同様の利点に加えて、基準反射光の強度による補正によって、各回折格子面間の表面特性による誤差の影響を補正することができ、より正確な分析を行うことが可能となるという利点がある。

#### 【0101】(D)第4実施形態

次に、図8を用いて本発明の第4実施形態を説明する。本実施形態に係るセンサチップ41は、その基本構成は第1実施形態と共通しており、表面を金属層43により被膜され、金属層43上の複数箇所に回折格子が形成された回折領域(測定スポット)46が部分的に設けられている。

【0102】ここでは、測定スポット46上に、結合物質47の他に非結合物質48を固定化する。非結合物質48は、検出すべき検出種と特異的に結合する性質を備えない物質である。試料中に複数の検出種が含まれる場合には、各検出種に応じた結合物質47及び非結合物質48がそれぞれ選択されて、それぞれ別々の測定スポット46に固定化してもよい。

【0103】したがって、結合物質が固定化された領域は反応領域となり、非結合物質が固定化された領域及び結合物質と非結合物質とが共に固定化されていない領域は非反応領域となる。また、金属層43を形成する金属

と検出種とが特異的に結合しない場合には、非結合物質 48 を固定化せずに、結合物質 47 及び非結合物質 48 が共に固定化されず金属層 43 が剥き出しとなっている領域を非反応領域としても良い。この他の構成は、第 1 実施形態と同一である。

【0104】この構造によれば、測定スポット 46 から反射される反射光は、反応領域で反射される反射光と非反応領域で反射される反射光とに別けられる。反応領域で反射される反射光は試料の定量的及び／又は定性的な要素によって変化するが、非反応領域で反射される反射光は試料の影響を受けず回折格子面の構造によってのみ強度が決定される。

【0105】このような特性により、本実施形態のセンサチップ 41 を用いて試料の分析を行う場合には、第 1 実施形態と同様の手法に加え、反応領域及び非反応領域のそれぞれにおいて表面プラズモン共鳴が発生する共鳴角度を算出するステップと、さらに、反応領域における共鳴角度から反応領域と同じ回折格子面上の非反応領域における共鳴角度を差し引いた共鳴角度を算出するステップとを行う。これにより、検出種が反応領域で結合物質と結合した時の反射光を、反応領域近傍の非反応領域で反射した反射光を基準として分析することができるため、第 1 実施形態と同様の利点に加えて、検出種が結合物質と特異的に結合することにより生じる変化を確実に分析することができる。

#### 【0106】(E) 第 5 実施形態

次に、図 9 を用いて本発明の第 5 実施形態を説明する。本実施形態は、第 1 実施形態の分析装置 10 の、試料流体が流れる流路 11a の上流に、試料流体を分離する分離装置 59 が設置された構造となっている。

【0107】分離装置 59 としては、試料の吸着性や分配係数に応じて分離を行う液体クロマトグラフィーや HPLC (high performance liquid chromatography), 試料の電気陰性度に応じて分離を行うキャピラリー電気泳動やマイクロチップ電気泳動、フローインジェクション或いはマイクロチャネルを用いた分離方法などが好適である。

【0108】マイクロチャネルは何らかのチップ表面に形成された試料が流れる溝のことであるが、この溝の一部に HPLC のカラム充填材に相当するものを詰めたり、溝表面に官能基を備えさせたりすることで、分離が可能となるものである。

【0109】また、フローインジェクションは試料が流れている状態で様々な反応を起こさせる手法であるが、例えば錯形成反応と溶媒抽出とを行い、試料中の検出種以外の物質を除去する等の処理をして、分離を行うことができる。

【0110】なお、もちろん上記以外の装置を分離装置として分析装置に取り付けても良い。

【0111】この装置を用いて分析を行なう場合、酵素

やたんばく質等の検出種を予め分離装置によって純粋な物質ごとに分離することができる。このため、純粋な物質となった検出種を分析することができ、より正確な分析を行うことができる。

【0112】また、分析手段として通常用いられている検出方法(吸光度検出、蛍光検出、化学発光検出、示差屈折計検出、電気化学検出など)と組み合わせることにより、各種の存在物質の存在量と、その中での検出対象種の特異的反応計測による測定とを同時に行うことができる。

#### 【0113】(F) 第 6 実施形態

次に、図 5 を用いて本発明の第 6 実施形態を説明する。本実施形態は、第 1 実施形態と基本的な構成は共通しており、光源 12 から照射された光はセンサチップで反射し、光検出部 13 で検出されるよう構成されている。

【0114】ここでは、検出種は蛍光や燐光などの光を発生しうる発光物質である。例えば、結合物質と反応することや、光源 12 から供給される光によって励起されることにより発光する発光物質がある。本実施形態では光検出部 13 がこの発光した光(発光光)を検出できるように構成されている。

【0115】このような構成により、実施形態 1 の利点に加え、本実施形態は発光光の検出結果を用いて試料の定量的及び／又は定性的な分析を行うことができ、したがってより正確な分析を行うことができる。特に蛍光などの化学発光は非常に高感度であるため、微小な反応を検出することが可能である。

#### 【0116】(G) 第 7 実施形態

次に、図 10、11 を用いて本発明の第 7 実施形態を説明する。本実施形態は、第 1 実施形態と基本的な構成は共通しており、光源 12 から照射された光はセンサチップ 71 で反射し、光検出部 13 で検出されるよう構成されている。

【0117】ここでは、図 10 に示すように、試料が流れる流路 70 が回折格子としての凹凸と直交する向きに複数設けられている。流路 70 はセンサチップ 71 表面を覆う蓋 72 とセンサチップ 71 との間に設けられ、2 本 1 組でセンサチップ 71 上の各測定スポット 6 を通過するよう形成されている。なお、流路 70 と流路 70 との間には、試料が混ざらないようにシールが施されている。また、図 11 に示すように、分析装置 10 の流路 70 の上流に、異なる試料流体それぞれを各流路 70 に割り当てて、割り当てた試料流体を各流路に導入する試料導入装置 79 が設置されている。

【0118】このような構成により、本実施形態では、第 1 実施形態と同様の手法に加え、異なる複数の試料を複数の流路 70 に割り当て、各流路 70 に割り当てられた試料を流しながらセンサ面に光を照射するステップを備えることができる。

【0119】このため、第 1 実施形態の利点に加え、本

実施形態は複数の試料を同時に分析することができるため作業が効率的に行える。また、複数の試料を同じ条件下で分析できるため、試料の違いを明確に分析することができる。

#### 【0120】(H) 第8実施形態

次に、図12を用いて本発明の第8実施形態について説明する。本実施形態にかかるセンサチップ81は、その基本構成は第1実施形態と共通しており、表面を金属層83により被覆され、金属層83上の複数箇所に回折格子が形成された回折領域(測定スポット)87が部分的に設けられている。

【0121】ここでは、測定スポット87の隣に、測定スポット87の表面の回折格子が形成された面が基準平面S0に対する傾斜角度の分布と同一の、基準平面S0に対する傾斜角度の分布を有する、回折格子が形成されていない平面(以下、非回折面という)を形成された非回折領域88が設けられている。その他の構成は、第1実施形態と同一である。

【0122】この構造によれば、センサチップ81の反射光は、測定スポット87で反射して表面プラズモン共鳴により強度を弱められた共鳴反射光と、非回折領域88で反射し、表面プラズモン共鳴の影響を受けていない基準反射光とに別けられる。

【0123】このような特性により、本実施形態のセンサチップ81を用いて試料の分析を行う場合には、第1実施形態と同様の手法に加え、計測される共鳴反射光の強度を、共鳴反射光が反射した測定スポットに対応する非回折領域で反射した基準反射光の強度で補正するステップを備えることができる。これにより、第1実施形態と同様の利点に加えて、基準反射光の強度による補正によって、各測定スポットの表面に設けられた回折格子面間の表面特性による誤差の影響を補正することができ、より正確な分析を行うことが可能となるという利点がある。

#### 【0124】(I) 第9実施形態

次に、図13を用いて本発明の第9実施形態について説明する。本実施形態にかかるセンサチップ91は、その基本構成は第1実施形態と共通しており、表面を金属層93により被覆され、金属層93上の複数箇所に回折格子が形成された回折領域(測定スポット)96が部分的に設けられている。

【0125】ここでは、測定スポット96のうちの一部の表面に、結合物質97を固定化し、他の測定スポット96の表面に、非結合物質98を固定化する。非結合物質98は、検出すべき検出種と特異的に結合しうる性質を備えない物質である。試料中に複数の検出種が含まれる場合には、各検出種に応じた結合物質97及び非結合物質98がそれぞれ選択されて、それぞれ別々の測定スポット96に固定化してもよい。

【0126】したがって、結合物質が固定化された測定

スポット表面の結合物質が固定化された領域は反応領域となり、非結合物質が固定化された測定スポット表面の非結合物質が固定化された領域及び結合物質と非結合物質とが共に固定化されていない領域は非反応領域となる。また、金属層93を形成する金属と検出種とが特異的に結合しない場合には、非結合物質98を固定化せずに、結合物質97及び非結合物質98が共に固定化されず金属層93が剥き出しとなっている領域を非反応領域としても良い。この他の構成は、第1実施形態と同一である。

【0127】この構造によれば、測定スポット96から反射される反射光は、反応領域で反射される反射光と非反応領域で反射される反射光とに別けられる。反応領域で反射される反射光は試料の定量的及び／又は定性的な要素によって変化するが、非反応領域で反射される反射光は試料の影響を受けず回折格子面の構造によってのみ強度が決定される。

【0128】このような特性により、本実施形態のセンサチップ91を用いて試料の分析を行う場合には、第1実施形態と同様の手法に加え、反応領域及び非反応領域のそれぞれにおいて表面プラズモン共鳴が発生する共鳴角度を算出するステップと、さらに、反応領域における共鳴角度から反応領域と同じ回折格子面上の非反応領域における共鳴角度を差し引いた共鳴角度を算出するステップとを行う。これにより、検出種が反応領域で結合物質と結合した時の反射光を、反応領域近傍の非反応領域で反射した反射光を基準として分析することができるため、第1実施形態と同様の利点に加えて、検出種が結合物質と特異的に結合することにより生じる変化を確実に分析することができる。

#### 【0129】(J) 第10実施形態

次に、図11、14を用いて本発明の第10実施形態を説明する。本実施形態は、第1実施形態と基本的な構成は共通しており、光源12から照射された光はセンサチップ101で反射し、光検出部13で検出されるよう構成されている。

【0130】ここでは、図14に示すように、センサチップ101表面に試料が流れる流路100が並列に複数設けられている。流路100はセンサチップ101表面を覆う蓋102とセンサチップ101との間に設けられている。なお、流路100と流路100との間には、試料が混ざらないようにシールが施されている。また、各流路100には第1実施形態と同様の測定スポット6が複数設けられている。

【0131】また、図11に示すように、分析装置10の流路100の上流に、異なる試料流体それぞれを各流路100に割り当てて、割り当てた試料流体を各流路に導入する試料導入装置79が設置されている。

【0132】この様な構成により、本実施形態では、第1実施形態と同様の手法に加え、異なる複数の試料を複

数の流路100に割り当て、各流路100に割り当てられた試料を流しながらセンサ面に光を照射するステップを備えることができる。

【0133】このため、第1実施形態の利点に加え、本実施形態は複数の試料を同時に分析することができるため作業が効率的に行える。また、複数の試料を同じ条件下で分析できるため、試料の違いを明確に分析することができる。

【0134】また、本実施形態と第4実施形態とを組み合わせたり、本実施形態と第9実施形態とを組み合わせたりすることができる。これにより、同一流路上の各回折格子面にそれぞれ反応領域と非反応領域とを形成することが可能となり、非反応領域からの反射光による補正を各流路を流れる試料ごとに行うことができる。

【0135】(K)その他

以上、本発明の実施の形態について説明したが、本発明は上述の実施の形態に限定されるものではなく本発明の趣旨を逸脱しない範囲で種々変形して実施することができる。例えば、第1実施形態では中央の回折格子面5eを基準平面S0に平行に配置していたが、図15に示す回折格子面116a~116eのように、端部の回折格子面116eを基準平面S0に平行に配置して、光の照射方向に向けて回折格子面116a~116dの傾斜角度を次第に大きくしていくような配置でもよい。ただし、同一の面数の回折格子面を設ける場合には、第1実施形態のように中央の回折格子面5eを中心にして左右に傾斜角度を大きくしていくような配置の方が中央部の出っ張りを低くすることができるので、試料液の流れを妨げることがない。

【0136】また、各回折格子面は必ずしも連続している必要はなく、図16に示す回折格子面126a~126eのように、一端は基準面S0と同レベルに配置して他端を立ち上げるにより基準面S0に対して傾斜角度を持たせるようにしてもよい。また、一つの測定スポットにより多くの回折格子面を配置する場合には、図17に示すように回折格子面136a~136kを複数列に配置してもよい。これにより、多数の回折格子面136a~136kをコンパクトに配置することが可能になる。

【0137】さらに、各実施形態では、特定平面S1に平行な一方向から見たときの基準平面S0に対する傾斜角度が次第に小さくなるように平面状の回折格子面5a~5iを順に配置したり、光が照射される側に向けて凸の曲面形状を有する回折格子面25を設けたりしているが、これは各回折格子面5a~5iからの反射光や、回折格子面25の各位置からの反射光が交錯することを防止するための配置或いは形状である。しかしながら、各回折格子面5a~5i或いは回折格子面25の各位置からの反射光を区別することができるならば、必ずしもこのような配置或いは形状に限定されるものではない。

【0138】また、各実施形態では、本発明のセンサチップをセンサ面に測定スポットが複数設けられた多点同時測定用(或いは多項目測定用)のセンサチップとして構成しているが、センサ面全体が一つの測定スポットであるセンサチップにも本発明を適用することは可能である。さらに、各実施形態では、金属層の表面に回折格子が形成された従来の一般的な構造の回折格子型センサチップに本発明を適用した場合について説明したが、本発明は他の様々な構造の回折格子型センサチップにも適用しうるものである。すなわち、光の照射によりエバネッセント波を生じさせる回折格子が形成された回折格子面と、回折格子面に沿って設けられ光の照射により表面に表面プラズモン波を誘起しうる金属層とを備えたセンサチップであれば、本発明を適用することができる。

【0139】また、各実施形態を組み合わせることも可能である。例えば、第3実施形態と第6実施形態とを組み合わせる実施したり、第5実施形態と第7実施形態とを組み合わせる実施したりしても良い。

【0140】特に、第3実施形態及び/又は第8実施形態と、第4実施形態及び/又は第9実施形態とを組み合わせ、非回折面による補正と非反応領域による補正とを共に行うようにすることは、正確な分析をより確実に行うことができるため好ましい。即ち、反応領域からの反射光に対し非回折面による補正を行って共鳴角を算出し、さらに、非反応領域からの反射光に対し非回折面による補正を行って共鳴角を算出して、両者の共鳴角から真の特異的反応に由来する共鳴角シフト量と検出種濃度とを算出することができるのである。

【0141】また、第4実施形態及び第9実施形態においては、非結合物質としては検出種と特異的反応を起こさない性質を持つ物質を、検出種に応じて選択する場合と、検出種に関係なく同一の物質を使う場合がある。

【0142】検出種に応じて非結合物質を選択する場合には、第4実施形態のように、同一回折格子面に結合物質と非結合物質との両方を固定化することが好ましい。しかし、センサチップを製造する手間を考慮すると、第9実施形態のように、結合物質が固定化された測定スポットの隣に存在する測定スポットに非結合物質を固定化して、結合物質が固定化された測定スポットの隣に存在する測定スポット自体を非反応領域とする方が有利である。

【0143】一方、全ての検出種に対して同一の物質を非反応物質として用いる場合には、ブロッキング剤として使用されているBSA (bovine serum albumin) や、ゼラチンなどを使用することができる。この場合には、第9実施形態のように、センサチップ上の1以上の測定スポットのすべての回折格子面に非反応物質を固定化し、その測定スポット自体を非反応領域とする方が製造上有利である。

【0144】

【実施例】以下に本発明を実施例を用いて説明するが、その要旨の範囲を越えない限り本発明は実施例に限定されるものではない。

【0145】(実施例1) 平板状のポリカーボネート製の基体の表面に、溝ピッチ約870 nm、溝深さ約40 nmの凹凸形状を形成し、この凹凸形状を回折格子とし、さらに基体の表面に厚さ約80 nmで金を蒸着して、センサチップを作成した。続いて、このセンサチップを、15 mm×25 mmの矩形に形成し、回折格子が長さ25 mmの辺と平行になるようにした。形成したセンサチップを図18に示した。

【0146】次いで、センサチップの長さ15 mmの辺の、一端からの距離がそれぞれ約5.5 mm、4 mm、5.5 mmである点を含む、センサチップの長さ25 mmの辺に平行な直線を折り目として、このセンサチップを約0.8°ずつ折り曲げた。つまり、図19に示すように、5.5 mm×25 mmの矩形の領域(以下、領域Aという)と4 mm×25 mmの矩形の領域(以下、領域Bという)とが、長さ25 mmの辺を接しており、領域Bの領域Aと逆側には、領域Bと5.5 mm×25 mmの矩形の領域(以下、領域Cという)とが、長さ25

mmの辺を接している。また、領域Bは、基準面に対し0°を保ち、領域Cは領域Bに対して約0.8°の角度をなし、領域Aは領域Bに対して約-0.8°の角度をなすように折り曲げた。したがって、領域Aと領域Cとがなす角度が約1.6°となっている。さらに、計測時には試料をセンサチップの凸側の面で測定できるように、回折格子がセンサチップの凸側の面となるようにした。

【0147】こうして作成したセンサチップの中央部の10 mm×10 mmの領域を測定スポットとして、共鳴角検出型のSPR測定装置FLEX CHIPST<sup>TM</sup> Kinetic AnalysisSystem (HTS Biosystems Inc.)で角度スキャンを行いながら反射光の強度を計測した。計測には波長約870 nmの光を入射光に用い、試料は精製水を用い、それぞれの領域で任意のポイント3箇所計測を行った。

【0148】計測された共鳴角前後での入射光の入射角と反射光強度との関係を、図20に示す。各グラフにおいて、反射光強度が最小となる角度が共鳴角である。それぞれの領域の計測結果を表1に示す。なお、SDは標準偏差、CVは変動係数である。

【表1】

領域	ポイント	精製水の共鳴角	平均	SD	CV(%)
A	A-1	21.616	21.641	0.024	0.111
	A-2	21.645			
	A-3	21.663			
B	B-1	20.802	20.791	0.011	0.051
	B-2	20.789			
	B-3	20.781			
C	C-1	19.818	19.860	0.038	0.189
	C-2	19.870			
	C-3	19.891			

【0149】なお、領域Aにおける3箇所の測定ポイントをそれぞれA-1、A-2、A-3と表記し、同様に領域Bにおける3箇所の測定ポイントをそれぞれB-1、B-2、B-3、領域Cにおける3箇所の測定ポイントをそれぞれC-1、C-2、C-3と表記した。表1に示すように、それぞれの領域の共鳴角の平均は、領域Aが21.641°、領域Bが20.791°、領域Cが19.860°となった。

【0150】次に、図18のような、上記のセンサチップを折り曲げず平板状のままとしたセンサチップを別途作成し、領域A、B、Cと同様に共鳴角検出型のSPR

測定装置FLEX CHIPST<sup>TM</sup> Kinetic Analysis Systemで角度スキャンを行いながら反射光の強度を計測した。入射光には波長約870 nmの光を用いた。試料は精製水を用いた。以下、平板状のセンサチップの測定スポットを領域Dという。この計測においては、領域Dの400箇所のポイントで計測を行った。

【0151】計測された共鳴角前後での入射光の入射角と反射光強度との関係を図21に示す。また、計測結果を表2に示す。

【表2】

領域	ポイント数	精製水の共鳴角	平均	SD	CV(%)
D	400	最大値 20.877	20.832	0.019	0.092
		最小値 20.797			

図21にあるように、領域Dでは共鳴角は全てのポイントで同じ角度となっていた。また、共鳴角の平均は、表2のように20.832°となった。

【0152】領域A、B、Cにおいて、領域内の回折格子は同じ溝ピッチと溝深さとを有しており、また計測した試料も同じ精製水であるため、各領域の共鳴角は本来同一の角度となるはずである。しかし、領域A、B、Cでは、角度を導入していない領域Dに比べて、そ

れぞれ-0.809°、0.041°、0.972°の角度を有するため、共鳴角が見かけ上変化したように測定された。以上の結果から、回折格子面に傾斜角度を導入することにより、回折格子面に入射する入射光の入射角を変えることができたことが確認された。

【0153】(実施例2) 実施例1と同様に、平板状のポリカーボネート製の基体の表面に、溝ピッチ約870 nm、溝深さ約40 nmの凹凸形状を形成し、この凹凸

形状を回折格子とし、さらに基体の表面に厚さ約80nmで金を蒸着して、センサチップを作成した。このセンサチップを折り曲げ、異なる傾斜角度を持つ面を26面形成した。以下、角度を持つそれぞれの面の領域を、それぞれ水平面に対してなす傾斜角度の小さい順に領域No. 1、領域No. 2と自然数の番号を付けて呼ぶ。

【0154】こうして26の異なる傾斜角度を持つ面を形成されたセンサチップを用いて、SPR測定装置FLEX CHIPS™ Kinetic Analysis Systemで角度スキャンを行いながら反射光の強度を計測した。試料は精製水を用いた。入射光としては波長が約870nmの光を用いた。共鳴角を特定し、傾斜角度を有していない実施例1の領域Dの測定結果と比較して、それぞれの領域がどれだけの傾斜角度を有しているかを特定した。測定結果を表3に示す。

【表3】

領域 No.	精製水の共鳴角	回折格子面の角度
1	21.768	-0.938
2	21.748	-0.914
3	21.734	-0.902
4	21.713	-0.881
5	21.697	-0.865
6	21.685	-0.833
7	21.572	-0.740
8	21.415	-0.583
9	21.364	-0.532
10	21.263	-0.431
11	21.164	-0.332
12	21.120	-0.288
13	21.053	-0.221
14	21.008	-0.176
15	20.954	-0.122
16	20.915	-0.083
17	20.864	-0.032
18	20.802	0.030
19	20.703	0.129
20	20.522	0.310
21	20.284	0.548
22	20.095	0.737
23	20.028	0.804
24	19.971	0.861
25	19.907	0.925
26	19.854	0.978

その結果、それぞれの領域は $-0.936^{\circ} \sim 0.978^{\circ}$ の角度を有していることが判明した。

【0155】次に、これらのセンサチップを用いて、SPR測定装置FLEX CHIPS™ Kinetic Analysis Systemで波長約870nmの光を入射光とし、濃度が2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%であるエタノール水溶液をそれぞれ試料として、反射光の強度を計測した。

【0156】それぞれの領域におけるエタノール濃度と、共鳴角がエタノール濃度の増加によって変化した変化量（以下、シフト量という）とを表4に示す。

【表4】

領域 No.	共鳴角 シフト量(度)							
	EtOH 0%	2.50%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
1	0.0000	0.0714	0.1367	0.2763	0.5883	0.9407	1.1919	1.4028
2	0.0000	0.0698	0.1359	0.2783	0.5934	0.9519	1.1885	1.4343
3	0.0000	0.0726	0.1412	0.2907	0.8005	0.9487	1.1738	1.4352
4	0.0000	0.0714	0.1373	0.2802	0.5898	0.9455	1.1919	1.4488
5	0.0000	0.0740	0.1418	0.2850	0.5988	0.9487	1.1885	1.4777
6	0.0000	0.0898	0.1388	0.2798	0.5911	0.9328	1.1738	1.4075
7	0.0000	0.0723	0.1409	0.2887	0.5956	0.9488	1.1771	1.4247
8	0.0000	0.0735	0.1441	0.2878	0.5983	0.9511	1.1844	1.4241
9	0.0000	0.0822	0.1679	0.3480	0.8277	0.9709	1.2037	1.4334
10	0.0000	0.0731	0.1420	0.2817	0.5980	0.9570	1.1932	1.4377
11	0.0000	0.0890	0.1373	0.2818	0.8012	0.9888	1.2188	1.4418
12	0.0000	0.0727	0.1381	0.2758	0.5912	0.9207	1.1873	1.4526
13	0.0000	0.0730	0.1408	0.2899	0.6178	0.9682	1.2071	1.4484
14	0.0000	0.0774	0.1548	0.3085	0.8228	0.9874	1.2217	1.4552
15	0.0000	0.0744	0.1459	0.2880	0.8114	0.9801	1.1994	1.4272
16	0.0000	0.0727	0.1401	0.2842	0.8218	0.9583	1.1994	1.4189
17	0.0000	0.0755	0.1454	0.2950	0.8290	0.9850	1.2042	1.4311
18	0.0000	0.0728	0.1484	0.3111	0.8278	0.9888	1.2120	1.4381
19	0.0000	0.0741	0.1520	0.3161	0.8290	0.9731	1.2131	1.4526
20	0.0000	0.0803	0.1639	0.3240	0.8252	0.9789	1.2157	1.4484
21	0.0000	0.0715	0.1488	0.3185	0.8318	0.9758	1.2108	1.4552
22	0.0000	0.0771	0.1585	0.3337	0.8417	0.9783	1.2204	1.4272
23	0.0000	0.0882	0.1839	0.3051	0.8255	0.9574	1.1977	1.4189
24	0.0000	0.0720	0.1434	0.2930	0.8112	0.9484	1.1845	1.4311
25	0.0000	0.0723	0.1439	0.2980	0.8232	0.9538	1.1885	1.4381
26	0.0000	0.0764	0.1529	0.3034	0.8238	0.9573	1.1970	1.4381
平均		0.0741	0.1482	0.2970	0.8120	0.9582	1.1995	1.4382
SD		0.0038	0.0092	0.0187	0.0183	0.0152	0.0139	0.0175
CV(%)		5.30	6.27	6.28	2.87	1.58	1.16	1.22

いずれの領域でも、各エタノール濃度に対して変動係数 (CV: coefficient of variation) は1.2%~6.3%と良好であった。また、いずれの領域でも同量の共鳴角のシフトを示した。以上の結果から、角度を有する回折格子面でも角度を有さない回折格子面と同等の計測精度を持つことが分かった。

【0157】(実施例3) 実施例2で取得した計測データのうち、入射光の入射角が21.5°であった際の測定データを選択し、その測定データの中でエタノール濃度が0%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%であるエタノール水溶液それぞれを試料としたときの、反射光強度が最小となる領域の角度を算出した。具体的には、それぞれの領域が有する角度(表

3)と、その領域における反射光強度とを用いて、反射光強度が最小となる角度を、回帰計算によって求めた。

【0158】この結果判明した、エタノール水溶液のエタノール濃度と、反射光強度が最小となる領域の角度、つまり共鳴角のシフト量との関係を図22に示す。

【0159】一般的に行われている方法、即ち、角度スキャンを行う方法で得られる共鳴角から、エタノール水溶液のエタノール濃度と、領域No. 7及び領域No. 15の回折格子面における共鳴角のシフト量との関係を調べた。この結果を図23に示す。

【0160】図22と図23とを比較した結果を表5に示す。

【表5】

エタノール濃度	最小反射光強度を示す回折格子面		領域No.7		領域No.15	
	角度	シフト量	共鳴角	シフト量	共鳴角	シフト量
0%	-0.723	0.000	21.672	0.000	20.954	0.000
2.50%	-0.622	0.101	21.844	0.072	21.029	0.075
5%	-0.539	0.184	21.712	0.140	21.100	0.146
10%	-0.382	0.341	21.880	0.288	21.242	0.288
20%	-0.032	0.690	22.167	0.595	21.585	0.611
30%	0.331	1.053	22.521	0.949	21.914	0.960
40%	0.533	1.258	22.749	1.177	22.163	1.199
50%	0.742	1.465			22.379	1.425

比較の結果、図22と図23とが各エタノール濃度に対して同様のシフト量を示していることが判明した。したがって、一般的に行われてきた方法の結果(図23)判明する共鳴角のシフト量が、本発明による回折格子面を保有するセンサチップを用いたことにより、入射光の入射角が一定の測定法で、最小反射強度を与える回折格子面が示す共鳴角の変化という形で得られる事が分かった。

【0161】(実施例4) 実施例2で取得した計測データのうち、入射光の入射角が21.5°の場合及び入射角が21.0°の場合のデータについて解析した。

【0162】入射光の入射角が21.5°の場合では、領域No. 2, 7, 10, 16, 19の反射光強度とエタノール濃度との関係を解析した。その結果を図24及び表6に示す。また、入射光の入射角が21.0°の場合では、領域No. 10, 13, 18, 20, 22の反



射光強度とエタノール濃度との関係を解析した。その結果を図25及び表7に示す。

【0163】

【表6】

入射角 21.5 度		回折格子面 領域				
エタノール濃度		No.2	No.7	No.10	No.18	No.19
0%		1278.07				
2.50%		1481.97	1101.32			
5%		1848.93	1223.44			
10%		2026.36	1590.83	1039.49		
20%		2541.48	2314.81	1580.55	1015.87	
30%		2789.89	2707.64	2369.13	1593.10	1078.98
40%			2825.08	2644.40	2158.68	1592.99
50%				2787.90	2484.18	2068.05

【表7】

入射角 21.0 度		回折格子面 領域				
エタノール濃度		No.10	No.13	No.18	No.20	No.22
0%		1353.38				
2.50%		1543.41	1048.68			
5%		1736.37	1157.24			
10%		2106.79	1517.15	1048.67		
20%		2607.08	2254.11	1735.63	1038.87	
30%		2839.95	2649.93	2403.10	1782.15	940.39
40%			2763.74	2624.11	2213.10	1279.24
50%				2738.40	2458.48	1790.14

【0164】図24から、入射光の入射角が21.5°の場合は、エタノール濃度が0%～10%の範囲は領域No. 2の反射光強度を、エタノール濃度が10%～30%の範囲は領域No. 10の反射光強度を、エタノール濃度が30%～50%の範囲は領域No. 19の反射光強度をそれぞれ用いることで、入射光の入射角が一定であっても広範囲なエタノール濃度域に対して計測が可能になることが確認された。

【0165】同様に、図25から、入射光の入射角が21.0°の場合は、エタノール濃度が0%～10%の範囲は領域No. 10の反射光強度を、エタノール濃度が10%～30%の範囲は領域No. 18の反射光強度を、エタノール濃度が30%～50%の範囲は領域No. 22の反射光強度をそれぞれ用いることで、入射光の入射角が一定であっても広範囲なエタノール濃度域に対して計測が可能になることが確認された。

【0166】したがって、従来の角度スキャンを行いながら反射光強度を測定する方法に比べ、入射光の入射角を一定にし、角度スキャンを行わない簡便な計測法でも広範囲な測定が可能であることが分かった。

【0167】(実施例5) 平板状のポリカーボネート製の基体の表面に、溝ピッチ約870nm、溝深さ約40nmの凹凸形状を形成し、この凹凸形状を回折格子とした。

【0168】さらに、この基体を、図26に示すように、回折格子と直交する方向の断面が、曲率半径が約1150mmの曲面となり、且つ、回折格子が基体の凸側の面にくるように加工した。次いで、この基体の表面に厚さ約80nmで金を蒸着して、センサチップを作成し

た。

【0169】このセンサチップを用いて、共鳴角検出型のSPR測定装置FLEX CHIPST<sup>TM</sup> Kinetic Analysis System (HTS Biosystems Inc.) で角度スキャンを行いながら反射光の強度を測定した。測定には波長約870nmの光を入射光に用い、試料は精製水を用いた。

【0170】センサチップ表面の、回折格子に直交する方向に約0.33mm間隔の領域における反射光の共鳴角を検出した結果を表8に示す。

【表8】

	曲面域A		曲面域B	
	共鳴角	差	共鳴角	差
	20.6269		20.6369	
	20.6302	0.0033	20.6400	0.0032
	20.6378	0.0074	20.6481	0.0080
	20.6467	0.0091	20.6514	0.0033
	20.6520	0.0053	20.6659	0.0146
	20.6585	0.0065	20.6695	0.0037
	20.6652	0.0267	20.6892	0.0197
	20.6887	0.0035	20.6966	0.0074
	20.6988	0.0111	20.7020	0.0054
	20.7082	0.0085	20.7074	0.0054
	20.7204	0.0122	20.7156	0.0084
	20.7255	0.0051	20.7262	0.0103
	20.7334	0.0078	20.7348	0.0086
	20.7562	0.0229	20.7408	0.0090
	20.7600	0.0038	20.7628	0.0218
	20.7738	0.0135	20.7720	0.0095
	20.7878	0.0143	20.7823	0.0103
	20.8013	0.0135	20.8008	0.0183
平均		0.0103		0.0098

各領域間の接面の角度差の合計が0.17°となり、本来両端部の接面がなすべき角度である0.3°よりも小さいため、曲率半径が設計よりも大きくなるよう形成されていたことが推定される。

【0171】しかし、0.33mm間隔の隣あう領域間の角度は平均0.010°と非常に小さい値に制御されており、曲面を形成した構造であってもセンサチップ表面に回折格子面を形成することができることが確認できた。

【0172】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明によれば、表面プラズモン共鳴センサチップの回折格子面に光の照射方向に対して角度の分布を持たせることにより、平行光を照射した場合でも回折格子面から得られる反射光の強度に分布が生じるので、センサ面全体について回折格子面から得られる反射光の強度と回折格子面への実質的な入射角度とに基づき共鳴角度をリアルタイムで算出することができるという利点がある。つまり、簡単な光学系の構成により、リアルタイム測定と大面積の同時測定とを同時に実現することができるという利点がある。

【0173】また、本発明によれば、表面プラズモン共鳴センサチップの回折格子面に光の照射方向に対して角度の分布を持たせることにより、ある一方向から光を照射した場合でも回折格子面から得られる反射光の強度に分布が生じるので、反射光の強度の変化量に基づき分析

を行う場合において実質的に計測レンジを拡大することができ、広い計測レンジが必要となる濃度域の広い試料についても対応することができるという利点がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の第1実施形態にかかるセンサチップの構成を示す模式的な斜視図である。

【図2】図1のセンサチップの要部の構成を示す模式的な斜視図である。

【図3】図1のセンサチップに結合物質を固定化した状態を示す模式的な斜視図である。

【図4】図1のセンサチップの製造方法の一例を示す模式的な斜視図であり、(a)～(c)の順に製造手順を示している。

【図5】本発明の第1実施形態にかかる分析装置の構成を示す模式的な模式図である。

【図6】本発明の第2実施形態にかかるセンサチップの要部の構成を示す模式的な斜視図である。

【図7】本発明の第3実施形態にかかるセンサチップの要部の構成を示す模式的な斜視図である。

【図8】本発明の第4実施形態にかかるセンサチップに結合物質及び非結合物質を固定化した状態を示す模式的な斜視図である。

【図9】本発明の第5実施形態にかかる分析装置の構成を示す模式的な模式図である。

【図10】本発明の第7実施形態にかかるセンサチップの要部の構成を示す模式的な斜視図である。

【図11】本発明の第7、第10実施形態にかかる分析装置の構成を示す模式的な模式図である。

【図12】本発明の第8実施形態にかかるセンサチップの構成を示す模式的な斜視図である。

【図13】本発明の第9実施形態にかかるセンサチップの構成を示す模式的な斜視図である。

【図14】本発明の第10実施形態にかかるセンサチップの構成を示す模式的な斜視図である。

【図15】図1のセンサチップにかかる回折格子面の配置形態の変形例を示す模式的な斜視図である。

【図16】図1のセンサチップにかかる回折格子面の配置形態の変形例を示す模式的な斜視図である。

【図17】図1のセンサチップにかかる回折格子面の配置形態の変形例を示す模式的な斜視図である。

【図18】本発明の第1実施例にかかるセンサチップの模式的な斜視図である。

【図19】本発明の第1実施例にかかるセンサチップの模式的な斜視図である。

【図20】本発明の第1実施例にかかる、入射光の入射角と反射光強度とを示すグラフである。

【図21】本発明の第1実施例にかかる、入射光の入射角と反射光強度とを示すグラフである。

【図22】本発明の第3実施例にかかる、エタノール水溶液のエタノール濃度と共鳴角のシフト量とを示すグラ

フである。

【図23】本発明の第3実施例にかかる、エタノール水溶液のエタノール濃度と共鳴角のシフト量とを示すグラフである。

【図24】本発明の第4実施例にかかる、エタノール水溶液のエタノール濃度と反射光強度とを示すグラフである。

【図25】本発明の第4実施例にかかる、エタノール水溶液のエタノール濃度と反射光強度とを示すグラフである。

【図26】本発明の第5実施例にかかるセンサチップの模式的な斜視図である。

【符号の説明】

1, 21 センサチップ(表面プラズモン共鳴センサチップ)

1a, 21a センサ面

2 基体

3, 23 金属層

4 凹凸面

5a～5i, 116a～116e, 126a～126e, 136a～136k 回折格子面(平面)

6, 26 測定スポット

7 結合物質

10 分析装置

11 ホルダ

11a, 70 流路

12 光源

13 光検出器

14 分析部

25 回折格子面(曲面)

31 センサチップ

33 金属層

35a～35i 回折格子面

36 測定スポット

37a～37i 非回折面

41 センサチップ

43 金属層

46 測定スポット

47 結合物質

48 非結合物質

59 分離装置

72 蓋

79 試料導入装置

71 センサチップ

S0 基準平面

S1 特定平面

81 センサチップ

83 金属層

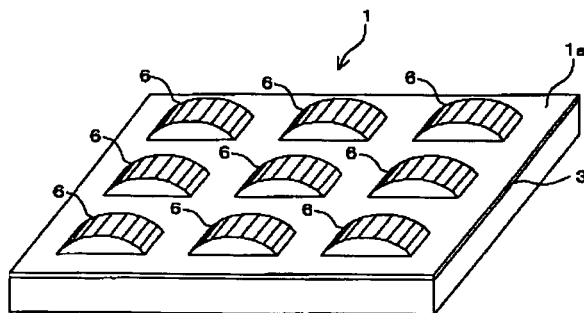
87 測定スポット

88 非回折領域

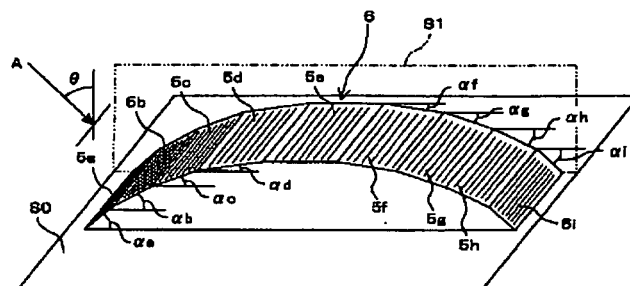
91 センサチップ  
93 金属層  
96 測定スポット  
97 結合物質  
98 非結合物質

100 流路  
101 センサチップ  
102 蓋

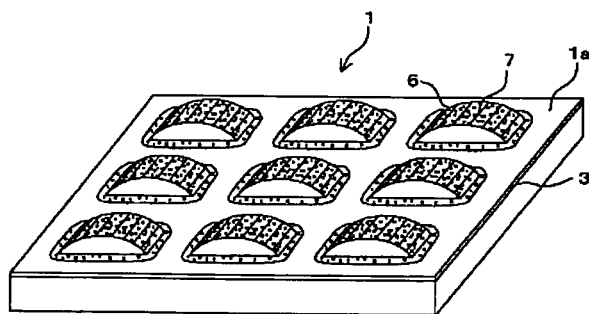
【図1】



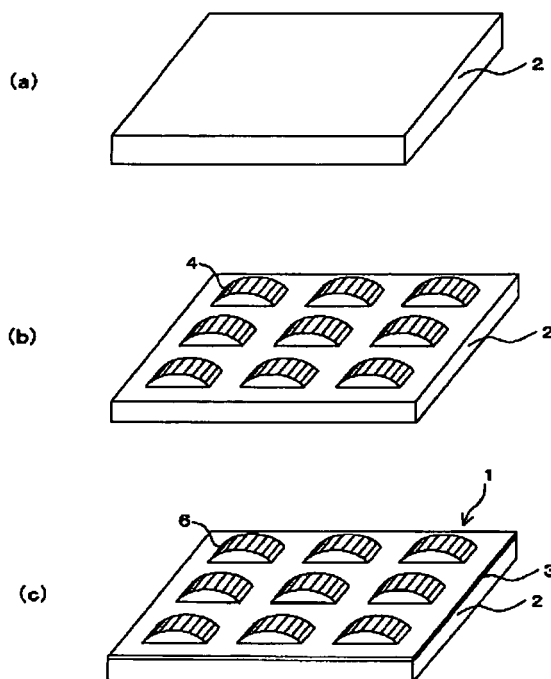
【図2】



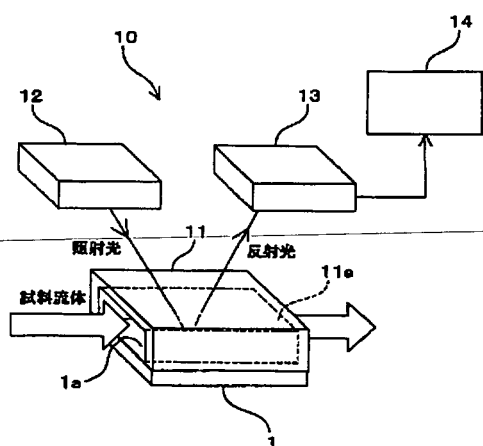
【図3】



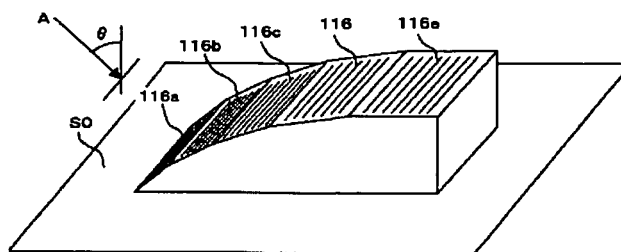
【図4】



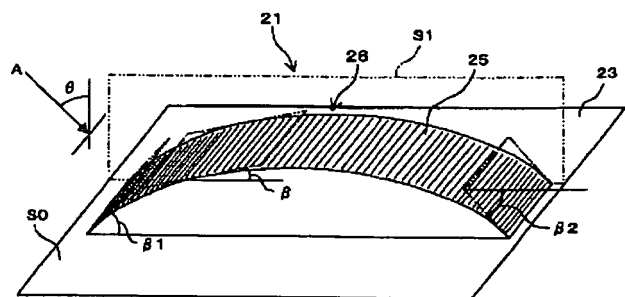
【図5】



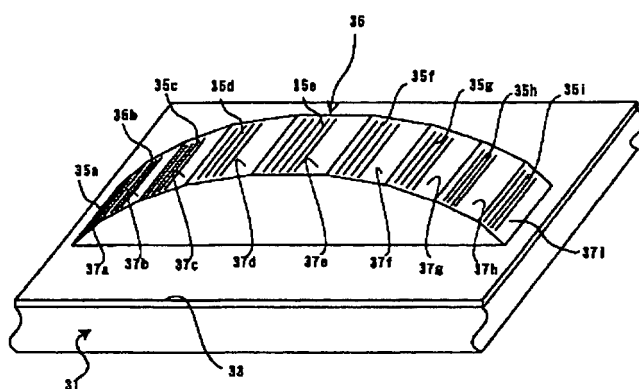
【図15】



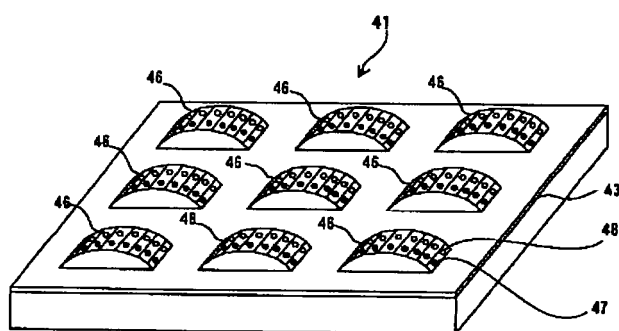
【図6】



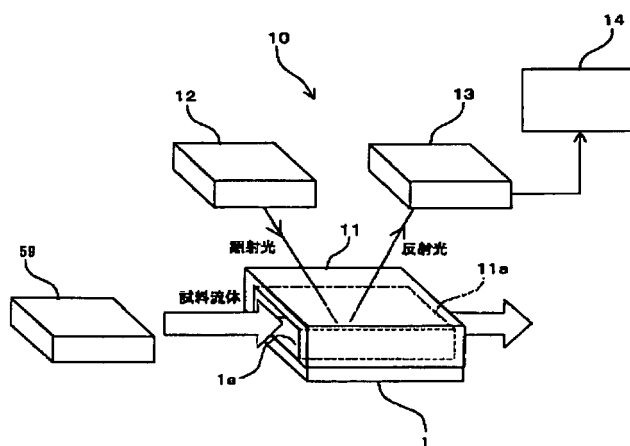
【図7】



【図8】



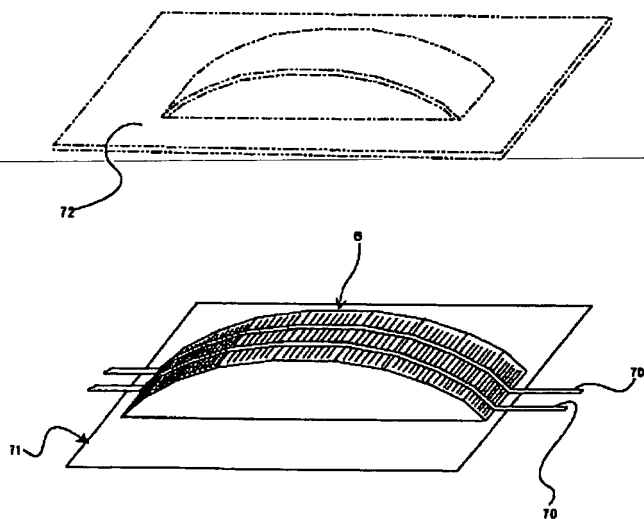
【図9】



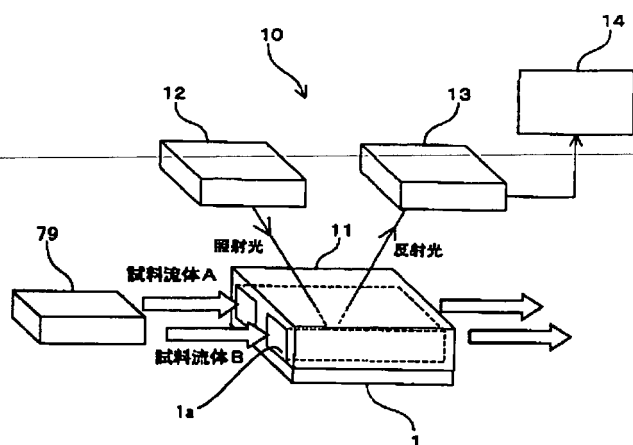
【図26】



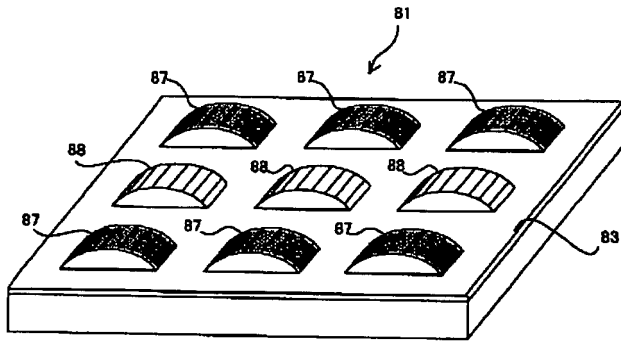
【図10】



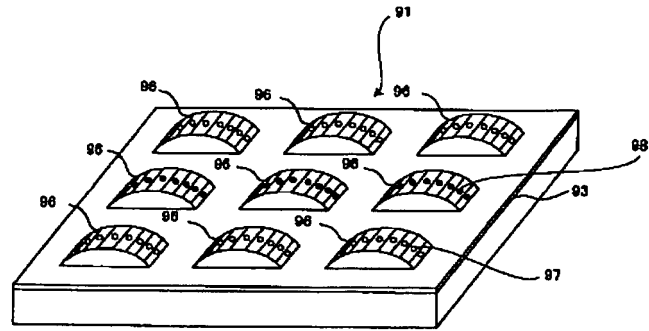
【図11】



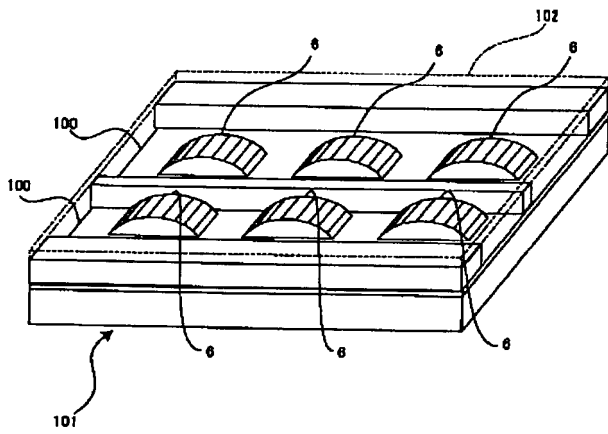
【図12】



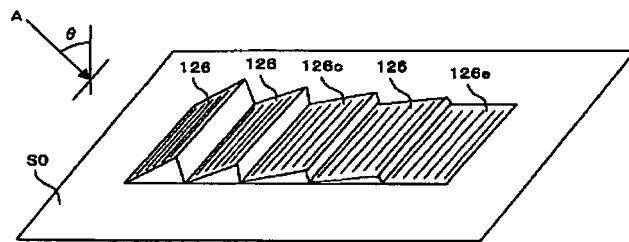
【図13】



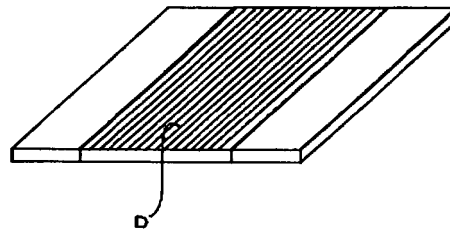
【図14】



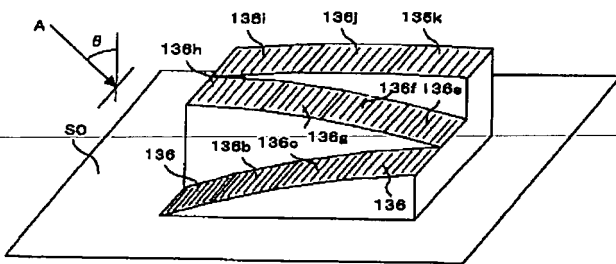
【図16】



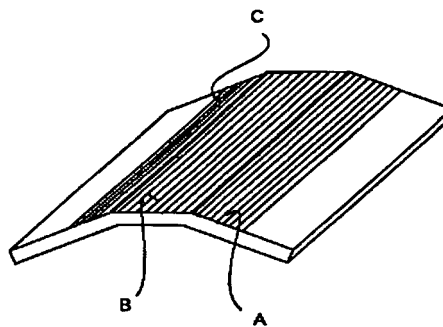
【図18】



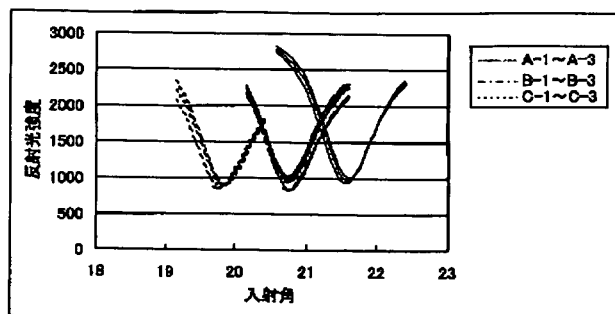
【図17】



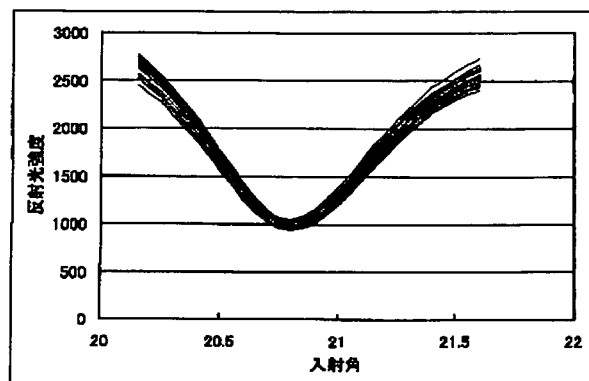
【図19】



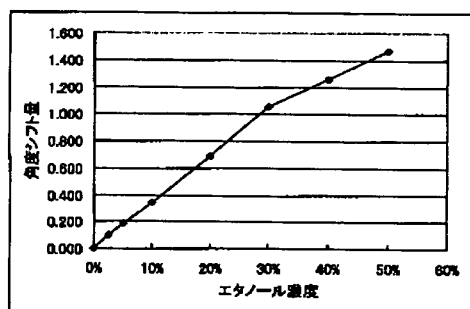
【図20】



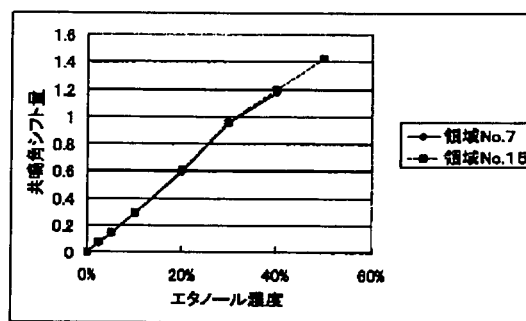
【図21】



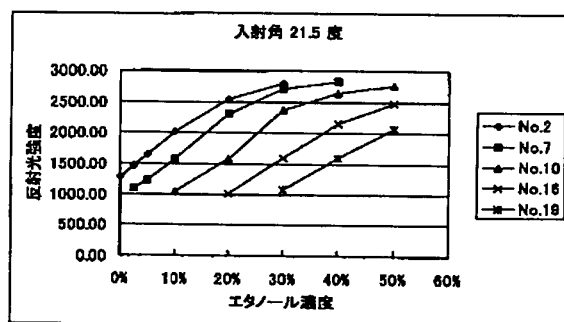
【図22】



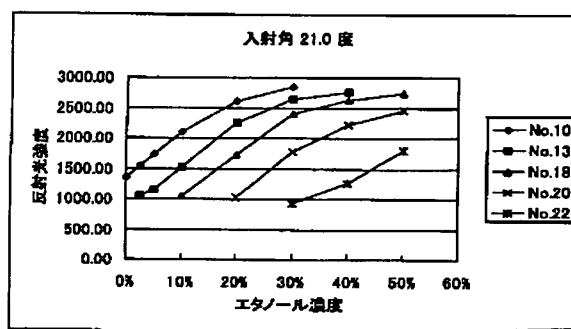
【図23】



【図24】



【図25】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup> 識別記号  
G 0 1 N 33/543 5 9 5

F I  
G 0 1 N 27/26

テマコード' (参考)

3 3 1 G  
3 1 5 K

(72)発明者 長池 一博  
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地  
三菱化学株式会社内

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA14 CA03 DA05 EA01  
EA14 EA18 EA19 GA07 GB19  
HA07 JA03 JA04 KA09 LA03  
NA11  
2G057 AA02 AA04 AB04 AB07 AC01  
BA05  
2G059 AA01 BB04 BB12 CC13 CC16  
DD12 EE02 EE05 EE07 FF11  
GG01 GG04 GG10 JJ01 JJ03  
JJ05 JJ19 KK04 MM05 MM14



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☒ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**